

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Luciana Rodrigues Camillo

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE
CITROS EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Xanthomonas*
axonopodis pv. *citri***

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na área
de Genética de Microorganismos.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Luciana Rodrigues
Camillo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Campinas - 2006

BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE
COLEÇÃO
UNICAMP

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
2162
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 70684
PROC. 16.7.00.123.00
C _____ S _____
PREÇO 11.00
DATA 17/11/06
BIB-ID 391685

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

C146a

Camillo, Luciana Rodrigues

Análise da expressão diferencial de genes de citros em resposta à infecção por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* / Luciana Rodrigues Camillo. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Celso Eduardo Benedetti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cancro cítrico. 2. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. 3. Biblioteca subtrativa suprimida (SSH). 4. Expressão gênica diferencial. 5. Laranja. I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

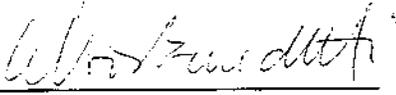
(rcdt/ib)

Título em inglês: Differential gene expression of citrus in response to infection by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.
Palavras-chave em inglês: Citrus canker; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; Supression subtracted hybridization (SSH); Differential gene expression; Oranges.
Área de concentração: Genética de Microorganismos.
Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.
Banca examinadora: Celso Eduardo Benedetti, Alexandre Morais do Amaral, Flávio Henrique da Silva.
Data da defesa: 13/07/2006.

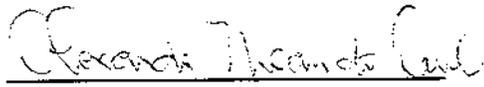
Campinas, 13 de julho de 2006.

Banca Examinadora

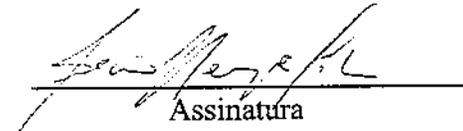
Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti


Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Morais do Amaral


Assinatura

Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira

Assinatura

Dra. Márcia Regina Soares da Silva

Assinatura

“Disseram-me que já não há mais ilhas desconhecidas, e que, mesmo que as houvesse, não iriam eles tirar-se do sossego dos seus lares e da boa vida dos barcos de carreira para se meterem em aventuras oceânicas, à procura de um impossível...”

O conto da Ilha desconhecida
José Saramago

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com a participação direta de algumas pessoas as quais foram muito importantes no sentido de discussão de resultados, manipulação das técnicas utilizadas, amizade e compreensão. Cito aqui algumas delas que tiveram uma maior importância por terem despendido tempo e atenção, colaborando muito para que o trabalho fosse desenvolvido.

À Dra. Yoko Bomura Rosato da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP e ao pesquisador Júlio Rodrigues Neto do Instituto Biológico (IBSBF) do Centro Experimental de Campinas pela disponibilização das cepas de *Xanthomonas*. Aos membros da pré banca Prof. Dr. Marcelo Menossi e Prof. Dr. Ivan Maia pelas discussões e sugestões. Particularmente ao Prof. Dr. Ivan Maia, e sua orientanda Andréa Akemi, pelo suporte técnico nos experimentos de qPCR. Aos membros titulares da banca: Prof. Dr. Alexandre do Amaral e Prof. Dr. Flávio Silva pelas críticas, sugestões e incentivo à continuidade deste trabalho.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Celso Eduardo Benedetti que desde antes do início desse projeto me ensinou algumas técnicas das quais eu aprendi sem nem imaginar que um dia seria sua aluna. Além disso, foi uma pessoa que acreditou, apesar de todas as dificuldades e obstáculos impostos, que o trabalho poderia ser desenvolvido. Agradeço também à sua orientação segura, otimismo e incentivo contribuindo assim para que o trabalho chegasse até aqui.

Outro agradecimento especial dirijo ao Andrés, meu parceiro de projeto do grupo, que por desenvolver trabalho semelhante ao meu, participou em praticamente todos os estágios de desenvolvimento do mesmo, fosse através de críticas, sugestões, material bibliográfico e, sobretudo, com muito incentivo e amizade. À Rosi também integrante do grupo, ademais da amizade, pelas dicas e contribuições e, paciência! Agradeço também à Tereza, amiga há muito tempo de quem recebi apoio incondicional nos bons e maus momentos fossem eles profissionais ou pessoais. À Márrcia, Amadeu e Fábio do Grupo MAS pela companhia agradável, divertida e vivida no ambiente profissional do Laboratório de Massas.

Às técnicas companheiras e fundamentais para o laboratório: Givanil, Veruska, Andréia, Eugênia, Zildene e Adriana.

Aos colegas de bancada e fora dela: William, Letícia, Anita, Alex, Marina e Eurípedes que foram importantes desde antes do início deste trabalho e de quem guardo saudades pelos momentos compartilhados.

Quero agradecer antes de tudo à minha família, pais, irmãos e avós, que à sua maneira, foram muito importantes para mim. Especialmente aos meus pais por terem dado suporte aos meus estudos, pelo amor, apoio, dedicação e preocupação. Agradeço especialmente à minha mãe e querida amiga, muito presente durante o processo e que me proporcionou força e determinação para seguir em frente sempre! À minha sobrinha única, Isabela, que me mostrou (o que eu já imaginava!) o quanto uma criança é importante em nossa vida. Agradeço o quanto aprendi e estou aprendendo com ela mesmo nos curtos períodos em que nos encontramos. Ela não sabe ainda, mas após seu nascimento, minha vida teve mais cor, mais alegria, mais esperança...

Aos amigos mais próximos e queridos, aos de longa data e aos novos, agradeço pelo apoio e que sabem o quanto foram importantes para mim, sem ordem e distinção: Alê loira, Alê morena, Cami's e Camila, Patrícia, Anita, Tutty, Rods, Ângela, Dú, Ucha, Márcio, Erika (Black's), Laurinha e Rachel. Aos companheiros de moradia os quais não posso e não vou esquecer: Cau, Fá, Luo, Carol, Lu e Jú! Ao Danilo pelo incentivo que talvez nem mesmo saiba que me foi dado, pela companhia e atenção dispensada no início desse processo.

Ao LNLS, FAPESP e CNPq.

ÍNDICE

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii

1. Introdução

1.1. A citricultura Brasileira	1
1.2. O cancro cítrico	2
1.3. Interações planta- patógeno	6
1.4. Estudos relacionados a patogenicidade de <i>Xanthomonas sp</i>	10
1.5. Estudos relacionados a patogenicidade de <i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i>	13

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos específicos	16

3. Material e Método

3.1. Material Biológico	17
3.2. Inoculação das folhas	17
- Método “pinprick”.....	18
- Infiltração no mesófilo	18
3.3. Extração do RNA	19
3.4. Eletroforese em gel agarose	20
3.5. Hibridização Subtrativa Suprimida (SSH)	20
3.6. Clonagem e amplificação dos fragmentos gerados pela técnica SSH	21
3.6.1 - Preparação das bactérias competentes	21
- Eletroporação	21
- PEG	22
3.6.2 - Transformação das bactérias e clonagem dos fragmentos	22
- Transformação por eletroporação	22
- Transformação por PEG	23
3.7. Dot e Northern Blot	24

3.8. Sequenciamento de DNA e buscas por homologia	24
3.9. Reação de transcrição reversa	25
3.10. PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)	25
3.11. Clonagem e expressão do domínio C-terminal de PthA1 (cPthA1) com cauda de histidina (6xHis-cPthA1)	27
3.12. Purificação de 6xHis-cPthA1 por cromatografia de afinidade	27
3.13. Clonagem de pthAs 1, 2 e 4 em vetor pBI121 para experimentos de agroinfecção em folhas de laranja	28
3.14. Preparação e transformação de células eletrocompetentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para agrotransfecção	29
4. Resultados e Discussão	
4.1. Ensaios de infiltração nas folhas	30
4.2. Extração dos RNAs	32
4.3. Obtenção da Biblioteca Subtrativa – SSH	33
4.4. Clonagem e amplificação dos fragmentos gerados pela técnica SSH	33
4.5. Dot e Northern Blotting	35
4.6. Análise da expressão dos genes identificados por dot blot através de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)	39
4.7. Identificação e provável função dos genes diferencialmente expressos	41
4.7.1. Genes envolvidos na percepção e transdução de sinal de auxinas/giberelinas ...	41
4.7.2. Genes envolvidos no tráfico, atracamento e fusão de vesículas	43
4.7.3. Genes envolvidos em resistência e defesa	44
4.7.4. Genes envolvidos no ciclo celular, síntese e degradação de proteínas	45
4.7.5. Genes envolvidos no metabolismo, transporte de carbono e nitrogênio e fotorrespiração	47
4.7.6. Genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários	48
4.7.7. Proteínas hipotéticas/ desconhecidas	49
4.8. Clonagem, expressão e purificação do domínio c-terminal de PthA1 (cPthA1) com cauda de histidina (6xHis-cPthA1)	51
4.9. Clonagem de <i>pthAs</i> 1, 2 e 4 em vetor pBI121 para experimentos de agroinfecção em folhas de laranja	52
5. Conclusões	55
6. Perspectivas	56
7. Referências Bibliográficas	57

RESUMO

A doença cancro cítrico, causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), emergiu como uma das principais ameaças à citricultura brasileira pois afeta todas as variedades comerciais de citros, diminuindo a produção e qualidade dos frutos e podendo se dispersar rapidamente em áreas de cultivo de citros. Entre os gêneros de *Xanthomonas*, foram encontrados muitos genes associados com patogenicidade e virulência, entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos nas interações entre *Xac* e laranjeira e os genes envolvidos no desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico em folhas de citros (*Citrus sinensis*) em resposta à infecção por *Xac*. Neste trabalho, foi analisada a expressão diferencial de genes envolvidos no desenvolvimento do cancro cítrico em folhas de laranja, em resposta à infecção por *Xac*. Para tanto foram construídas duas bibliotecas de Hibridização Substrativa Suprimida (SSH) com mRNAs de folhas infiltradas com *Xac* ou H₂O após 10 dias de inoculação. O “screening” das bibliotecas foi feito por dot blot e 17 genes diferencialmente expressos foram sequenciados e identificados por homologia no banco de dados ncbi-BLAST contra o banco de dados de EST de citros. A expressão gênica diferencial foi analisada por Northern Blot e PCR em tempo real (qPCR). Para complementar nossos dados, a expressão dos 17 genes diferenciais foi analisada a partir de cDNAs de folhas de citros que foram infiltradas com *Xac*, H₂O ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (*Xaa*), que não é patogênica à laranja, mas causa cancro no limão galego. Nossos resultados demonstraram que *Xac* e *Xaa* induzem e reprimem o mesmo grupo de genes, porém em diferentes níveis. Nós identificamos que ambos patógenos alteram as vias de transdução de sinal de auxina, tráfico e fusão de vesículas, resposta de defesa e doença, síntese de proteínas e ciclo celular, metabolismo de carbono-nitrogênio e metabolismo secundário. A análise desses genes poderá ser de grande importância para o entendimento dos eventos que levam ao desenvolvimento dos sintomas do cancro.

ABSTRACT

The citrus canker disease, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), has emerged as one of the major threats to the Brazilian citriculture because it affects all commercial citrus varieties, decreases the production and quality of the fruits and can spread rapidly in the citrus growing areas. The symptoms include canker lesions, leading to abscission of fruits and leaves and general tree decline. Within the genus *Xanthomonas*, several genes have been found associated with pathogenicity and virulence. However, little is known about the mechanisms involved in the *Xac*- citrus interaction and the development of the canker disease. In this work we analyzed the differential expression of genes involved in the development of the canker disease in sweet orange (*Citrus sinensis*) leaves in response to *Xac* infection. Therefore we constructed two Supression Subtracted Hybridization (SSH) libraries with mRNA from leaves infiltrated with *Xac* or water after 10 days of inoculation. The libraries were screened by dot blot and the 17 differentially expressed genes were sequenced and identified through BLAST searches against the Citrus EST and protein databases. The differential gene expression was evaluated by Northern blot and Real Time PCR (qPCR). To complement our analysis, the expression of 17 genes was compared in cDNA samples from citrus leaves that had been infiltrated with *Xac*, water or *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (*Xaa*), wich is not pathogenic to orange but causes canker in key lime. Our results show that *Xac* and *Xaa* induce and repress a similar set of genes, however at different levels. We found that both pathogens altered the pathways of auxin transport and signaling, vesicle trafficking and transport, cell cycle and protein synthesis, photorespiration and disease response. Further analysis of these genes will be of great importance to understand the events triggering the development of the canker symptoms.

Lista de Figuras

Figura 1- Fotografias das lesões causadas pela doença cancro cítrico: a) cancro presente nas folhas de citros, b) cancro presente nos frutos, c) lesão causada pela larva minadora do citros e d) Liberação de bactérias *Xac* de um estômato aberto

Figura 2- Erradicação de focos do cancro

Figura 3- Modelo de translocação e interação entre a proteína AvrBs3 de *Xanthomonas vesicatoria* com alvos da célula hospedeira.

Figura 4- Estrutura primária da proteína PthA1

Figura 5- Análise dos sintomas de folhas de laranja, variedades Hamlin, Pêra e Valência, infiltradas com suspensão bacteriana (cepas 1421 e 306) após 10 dias de infiltração em casa de vegetação.

Figura 6 - Desenvolvimento dos sintomas do cancro em folhas de laranja (*Citrus sinensis*), variedades Pêra, Hamlin e Valência, após 14 dias de infiltração com suspensões bacterianas de *Xac* (1421 e 306) crescidas em meio líquido previamente incubadas com pedaços de folhas das respectivas hospedeiras.

Figura 7- Sintomas do cancro observados em folhas de laranja Pêra após 72 horas e 10 dias de infiltração com suspensões de *Xac* (cepa 306).

Figura 8- Amostras de RNA de folhas não infiltradas e infiltradas, comparadas à um RNA controle para a verificação de degradação em gel de agarose.

Figura 9- Resultado dos fragmentos diferenciais subtraídos obtidos na bibliotecas forward e reversa: 1º e 2º PCRs gerados demonstrando a presença de cDNAs subtraídos e não subtraídos.

Figura 10- Análise da amplificação dos clones que apresentaram adaptadores ligados em suas extremidades em ambas bibliotecas.

Figura 11- Amplificação dos clones de ambas bibliotecas com os primers M13 F e M13R.

Figura 12- Resultado das hibridações de clones das bibliotecas forward e reversa gerados com primers N e M13, hibridizados com as respectivas sondas subtraídas ou com os produtos da transcrição reversa de mRNAs de folhas infiltradas com água ou *Xac* para comparação.

Figura 13- Amplificação dos cDNAs de folhas infiltradas com *Xac* e H₂O com primers OPP.

Figura 14- Membranas contendo clones amplificados com primers Nested e M13 e hibridização das mesmas com sondas geradas com primers OPPs.

Figura 15- digestão de 4 dos clones isolados por dot blot. Fragmentos clonados liberados foram usados como sonda.

Figura 16- Northern blot de seis dos genes diferencialmente expressos

Figura 17- Northern blot de RNA total de folhas de citrus hibridizados com a sonda EST CK937155, mostrando a expressão similar entre os tratamentos *Xac*, *Xaa* e água- 48 horas. B) Amplificação por qPCR de amostras de cDNAs de folhas infiltradas com os três tratamentos (*Xac*, *Xaa* e H₂O).

Figura 18- Exemplo de resultados obtidos pelo software 7500 System SDS na amplificação do gene diferencial 1AB5. A) Curvas de dissociação dos PCRs em tempo real obtidos pela amplificação do clone diferencial 1AB5 a partir de amostras água, *Xaa*, *Xac*. B) Resultado da expressão diferencial do gene 1AB5 nos tratamentos H₂O, *Xaa* e *Xac*.

Figura 19- Curva de crescimento de *Xac* e *Xaa* em folhas de laranja Pêra durante seis dias após a infiltração.

Figura 20- Expressão e purificação do domínio C-terminal de PthA1 com cauda de histidina (cPthA1).

Figura 21- A) Digestão dos clones transformados com diferentes pthAs com a enzima *Ssp*. B) Digestão de um clone para a liberação do vetor pBI121 e digestão dos pthAs para a ligação no vetor pBI121.

Figura 22 – Amplificação por PCR de colônia dos genes pthAs 1 e 4 fusionados a GFP com os primers pthAN2 e EGFP-R.

Lista de tabelas

Tabela 1- Apresentação dos principais produtores de laranja

Tabela 2- Sequência dos primers (iniciadores) utilizados nos experimentos desenvolvidos durante o projeto.

Tabela 3- Sequência dos primers gerados para amplificação dos clones diferenciais por qPCR.

Tabela 4- Identificação dos clones diferenciais isolados a partir das análises de dot blot.

Tabela 5- Resultados de qPCR dos genes expressos diferencialmente em folhas de laranja doce infiltradas com *Xac*, *Xaa* e H₂O após 48 h e 10 dias de infecção.

Lista de abreviaturas

AAD: domínio ácido de ativação da transcrição
avr: genes de avirulência
CANECC: Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico
CD: dísculo circular
cDNA: DNA complementar
CVC : Clorose Variegada dos citros
DEPC: Dietil-pirocarbonato
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
FUNDECITRUS: Fundo de Defesa da Citricultura
HBL: Huanglongbing
HR: Resposta de hipersensibilidade
Hrp: *hypersensitive response and pathogenicity*
IPTG: isopropil- β - D- tiogalactopiranosídeo
LB: Luria Bertani
MOPS: ácido 4-morfolino propano sulfônico
mRNA: RNA mensageiro
NLS: sinal de localização nuclear
OD₆₀₀: densidade ótica a 600 nm
PR: Proteínas Relacionadas à Patogenicidade
qPCR: PCR quantitativo em tempo real
ROS: Espécies reativas de oxigênio
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SSH: Hibridização Subtrativa Suprimida
TALHÃO: termo referente a plantações comerciais, sendo: quantidade de plantas delimitadas de outras existentes no mesmo pomar separado por arruamentos, estradas, carregadores ou outro meio qualquer empregado pelo proprietário para identificá-lo ou distingui-lo.
Xaa: *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*
Xac: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

1. Introdução

1.1 – A citricultura Brasileira

As atividades exportadoras de produtos cítricos brasileiros têm revelado sua importância para a economia do país, destacando-se no âmbito dos agronegócios e, principalmente, refletindo-se favoravelmente na balança comercial. Desde 1980 o Brasil é considerado o maior produtor e maior exportador mundial de suco concentrado de laranja (Neves *et al.*, 2001; Rodrigues Neto e Baldini Ribeiro, 2002). Entretanto, a laranja como fruta fresca de mesa (*in natura*) tem pouca importância nas exportações, pois sofre barreiras não-tarifárias, mas técnicas e fitossanitárias em importantes mercados importadores como os Estados Unidos. Laranjas *in natura* são impedidas de entrar em território americano por estarem fora das especificações técnicas estabelecidas por órgãos internacionais, uma vez que o Brasil não é considerado área livre da "pinta preta" e do "cancro cítrico". Além disso, na década de 60, a citricultura brasileira, particularmente a paulista, voltou-se para a produção de matéria-prima para a indústria de processamento de suco, não havendo uma preocupação com a produção comercial de frutas *in natura* adequada às rígidas exigências do mercado externo (Neves *et al.*, 2001).

O forte das exportações da citricultura se dá no suco concentrado congelado, considerado o principal item de comercialização, representando 72% do valor dessas exportações. Para se ter uma idéia de sua importância, em 2003 a produção de suco concentrado ocupou a segunda posição entre os produtos comercializados no mercado internacional, ficando somente atrás das exportações de aviões (Neves *et al.*, 2001; Fundecitrus, 2006).

O Brasil mantém a posição de maior produtor mundial de laranja (Tabela 1), com uma área de cultivo de 628 mil hectares. Somente o Estado de São Paulo produz 53% da produção mundial de suco e emprega atualmente mais de 400 mil pessoas, gerando divisas ao redor de 1,5 bilhões anuais. Em 2003 o setor movimentou US\$ 3,23 bilhões, sendo 49% de toda a produção brasileira de frutas representada pela produção de laranjas. No ano safra 2004/05 foram produzidas 360,7 milhões de caixas de 40,8 Kg (Abecitrus, 2006; Fundecitrus, 2006).

Tabela 1. Principais produtores de laranja. Os números apresentados representam volume em milhões de caixas de 40,8 Kg (extraída do site <http://www.abecitrus.com.br>).

País/Região	Produção 1980/89(*)	% - A	Produção 2002/03	% - B	Delta (%) - A/B
Estados Unidos	<u>165,51</u>	17,2	<u>240,25</u>	16,4	45,2
Brasil	<u>265,61</u>	27,7	<u>367,01</u>	25,1	38,2
Mediterrâneo	<u>219,58</u>	22,9	<u>263,60</u>	18,0	18,9
México	<u>32,45</u>	3,4	<u>94,07</u>	6,4	39,7
China	<u>8,55</u>	0,1	<u>116,35</u>	7,5	992,6
Outros	<u>266,84</u>	27,8	<u>388,92</u>	26,6	54,2
Total	<u>958,55</u>	100,0	<u>1.463,50</u>	100,0	52,6

A citricultura também é alvo constante de inúmeras pragas e doenças que podem causar danos irreversíveis às plantações. A quantidade e a qualidade das frutas cítricas são freqüentemente ameaçadas devido aos danos causados à planta, que dependendo da intensidade do ataque, pode torná-las improdutivas ou levar à sua erradicação. Dentre as principais doenças com grande impacto econômico que afetam a citricultura brasileira destacam-se a morte súbita dos citros, a clorose variegada dos citros (CVC), mancha de alternária, tristeza dos citros, huanglongbing (HLB) (ex- greening) e o cancro cítrico.

1.2 – O cancro cítrico

O cancro cítrico é uma doença causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), originária da Ásia, provavelmente Sul da China, Indonésia ou Índia, onde se presume que as espécies de citros tiveram origem, sendo disseminadas por toda a Ásia, Japão, África, Austrália, Nova Zelândia, algumas ilhas do Pacífico, Oriente Médio, Estados Unidos e América do Sul (Goto, 1992).

O cancro cítrico foi diagnosticado no Brasil em 1957 no município de Presidente Prudente, Estado de São Paulo (Bitancourt, 1957) e atingiu a região da citricultura paulista em 1979. Desde então milhões de reais são gastos anualmente com a erradicação de pomares infectados com a doença, que é considerada uma das mais graves da citricultura, pois ataca todas as variedades comerciais de citros e é de fácil disseminação.

A doença é causada por diferentes patótipos que são classificados pela indução de sintomas em diferentes hospedeiras. A forma asiática ou cancrose A é causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) e apresenta importância econômica por ser a mais virulenta e por afetar todas as variedades de citros comerciais. As cancroses B e C são causadas pela bactéria *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (*Xaa*). O tipo B infecta preferencialmente o limão verdadeiro (*Citrus limon*), mas pode também afetar uma faixa restrita de hospedeiros que ocorrem somente na Argentina, Uruguai e Paraguai (Cubero e Graham, 2002). O tipo C ataca somente limão Galego (*C. aurantifolia*) e ocorre apenas em determinadas regiões do estado de São Paulo (Schubert *et al.*, 2001). Há ainda a cancrose E, causada por *X. axonopodis* pv. *citrumelo* que afeta principalmente o porta-enxerto citrumelo “Swingle” (*C. paradisi* X *Poncirus trifoliata*) e ocorre na Flórida (Graham e Gottwald, 1991). *X. axonopodis* pv. *citri* “star” são linhagens atípicas de *Xac* adaptadas a temperaturas elevadas e ocorrem no sudoeste da Ásia (Vernière *et al.*, 1998).

Os sintomas induzidos pelas várias formas de cancro são similares e facilmente visíveis nos frutos, ramos, folhas e também em raízes expostas. Nas folhas, as lesões ocorrem como pústulas esponjosas circundadas ou não por um halo amarelado, sendo aparentes em ambas faces da folha devido à hiperplasia do tecido (Figura 1-A). Nos frutos a doença se manifesta pelo surgimento de pequenas manchas amarelas, que se desenvolvem e podem ocupar grande parte da epicarpo do fruto. As manchas são salientes, mais superficiais, semelhantes à verrugas e de cor marrom no centro. Em estágio avançado, as lesões provocam o rompimento do epicarpo favorecendo a entrada de agentes secundários causadores da podridão, depreciando o produto para o consumo (Figura 1-B). Nos ramos também são formadas lesões salientes, corticosas e de tamanhos variáveis. As lesões bem desenvolvidas causam rompimento da epiderme, causando a diminuição da vida ativa da planta além de promover a queda prematura de folhas e frutos e o não desenvolvimento dos que permanecem na planta (Rodrigues Neto e Baldini Ribeiro, 2002; Graham *et al.*, 2004; Fundecitrus, 2006).

O patógeno se espalha com facilidade nos pomares e não existem medidas que eliminem completamente a bactéria, dessa forma, quando detectadas as infecções, são exigidas medidas drásticas de controle como a erradicação das plantas doentes e das demais plantas suspeitas de conter a bactéria. Por tratar-se de uma praga quarentenária o comércio de frutos cítricos, suco concentrado e seus derivados são regulamentados por legislação internacional e a não adoção de

medidas de exclusão/ erradicação impede o comércio destes produtos para países livres do patógeno (IAPAR, 2002; Abecitrus, 2006; Fundecitrus, 2006).

A dispersão do patógeno é altamente influenciada por condições ambientais de umidade e temperatura, como chuvas, ventos e umidade nas lesões, além da idade e variedade cítrica, uma vez que plantas na fase juvenil apresentam maior suscetibilidade à doença. A bactéria também é facilmente disseminada pelo homem através de veículos, roupas, materiais utilizados para a colheita e transporte de mudas contaminadas, e pode sobreviver por vários anos em material vegetal cítrico contaminado e destacado da planta. Em outros materiais, como metal, plástico, madeira e tecido, a sobrevivência da bactéria é mais curta, geralmente de dias a semanas. A entrada do patógeno ocorre através dos estômatos, ferimentos causados por materiais de colheita ou pelas galerias formadas (Figura 1-C) pela larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), que pode aumentar consideravelmente a susceptibilidade da planta à doença (Bergamin-Filho *et al.*, 2000; Rodrigues Neto e Baldini Ribeiro, 2002; Fundecitrus, 2006). A bactéria multiplica-se de 3-4 unidades de log por lesão sob condições ótimas de umidade e temperatura (20 e 30° C) e as células bacterianas podem emergir dos estômatos abertos (Figura 1-D) (Graham *et al.*, 2004). A resistência observada em condições de campo pode estar relacionada com o número e a estrutura dos estômatos (Brunings e Gabriel, 2003).

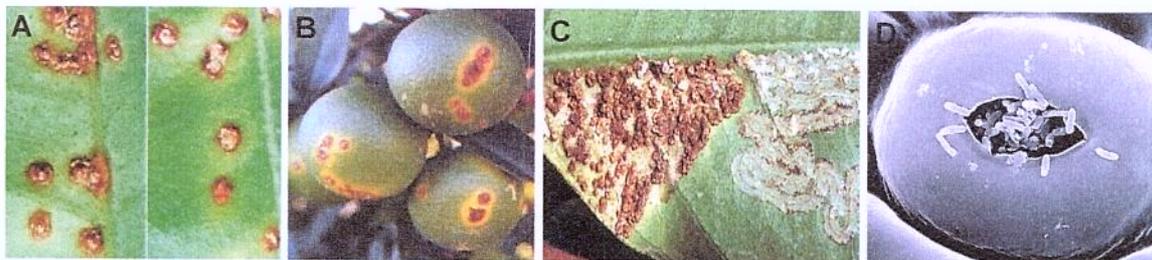


Figura 1. A) Lesões corticosas presentes em ambas faces da folha de laranja. (www.fundecitrus.com.br) B) Sintomas de cancro nos frutos de laranja. (fotos de Rodrigues Neto e Baldini Ribeiro, 2002). C) Folha de laranja com galerias formadas pela larva minadora dos citros, que expõe o tecido à infecção. D) Liberação de bactérias *Xac* de um estômato aberto após 5 dias de infiltração no mesófilo da folha com 10^5 cfu/mL (fotos extraídas de Graham *et al.*, 2004).

Desde o aparecimento do cancro cítrico no Brasil, foram iniciadas práticas de controle nas culturas para impedir a dispersão da bactéria. Para tanto foi implementada uma campanha governamental de erradicação da doença, onde plantas infectadas em pomares e em viveiros, sintomáticas ou não, foram erradicadas e o transporte de material cítrico e novos plantios foram proibidos (Bitancourt, 1957; Santos, 1983). Em 1974, o Ministério da Agricultura

instituiu a CANECC (Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico) que adotou várias metodologias para a eliminação das plantas doentes, como podas drásticas e desfolhamento químico (Ribeiro, 1983; Santos, 1983; Namekata et al., 1996). Em 1996, concomitantemente com a introdução da larva minadora do citros (*Phyllocnistis citrella*), a campanha de erradicação da bactéria por meio da eliminação de partes da planta não obteve o sucesso desejado (Rodrigues Neto e Baldini Ribeiro, 2002). Para auxiliar o trabalho realizado pela CANECC, foi criado, em 1977, o Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura), uma associação mantida por citricultores e indústrias processadoras de frutas cítricas, voltadas para a promoção da sanidade dos pomares.

Em 1999, a Comissão Executiva Estadual da CANECC/SP propôs a inclusão de um novo método oficializado pela Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, através da Portaria nº 17/99. Tal portaria determina a eliminação total do talhão (área comercial que apresenta no mínimo 200 mudas) quando a contaminação de plantas for superior a 0,5% ou a eliminação do foco e das plantas presentes em um raio mínimo de 30 metros, sendo que por dois anos não podem ser replantadas plantas cítricas na área erradicada (Figura 2). Portanto, atualmente no País, essa é a principal forma de controle, além da adoção de medidas preventivas como aquisição de plantas de viveiros certificados, controle químico e biológico (*Ageniaspis citricola*) da larva minadora, utilização de bactericidas nos materiais de colheita e transporte (solução de amônia quaternária), inspeção regular dos pomares e viveiros (educação e conscientização dos citricultores) e uso de quebra-ventos utilizados nas plantações, constituindo-se em medidas efetivas no controle da doença (Gottwald e Timmer, 1995; Rodrigues Neto e Baldini Ribeiro, 2002).

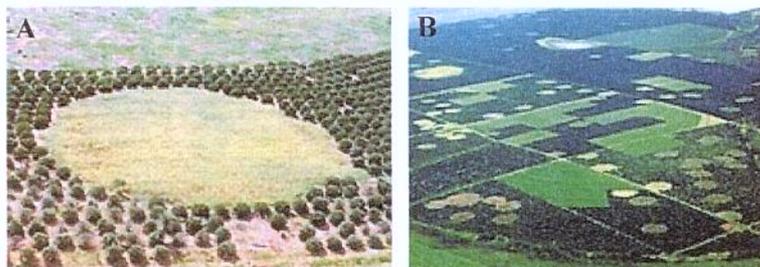


Figura 2. A) Erradicação de focos do cancro em um raio de 30 metros. B) Vista aérea de propriedades nas áreas onde foi feita a erradicação no Estado de São Paulo (extraído do site: www.fundecitrus.com.br)

A combinação de quebra ventos e *sprays* de cobre podem reduzir a incidência do cancro em folhas e frutos até níveis não detectáveis em cultivares tolerantes no campo. Além disso,

recorre-se às podas realizadas em épocas de seca, quando as condições ambientais são desfavoráveis à propagação da bactéria para as árvores adjacentes não infectadas (Leite Jr e Mohan, 1990).

Os métodos de erradicação das plantas contaminadas causam prejuízos incalculáveis ao setor que emprega milhares de trabalhadores e é a principal atividade econômica de mais de 300 municípios do Estado de São Paulo e do sul do Triângulo Mineiro. Levantamentos amostrais realizados pela Fundecitrus nos últimos três anos revelam incidências de talhões contaminados inferiores a 1% (Fundecitrus, 2006).

Devido aos prejuízos causados por patógenos que atacam cultivares de citros de importância econômica, a FAPESP criou dois projetos na área de genômica de microorganismos, já finalizados, que consistiram no seqüenciamento completo dos genomas das bactérias *Xac* (Da Silva *et al.*, 2002) e *Xylella fastidiosa*, causadora da doença Clorose Variegada de Citros (CVC; Simpson *et al.*, 2000).

1.3 - Interações planta- patógeno

As plantas desenvolveram sofisticados mecanismos de resposta aos estresses bióticos e abióticos. O encontro entre células da planta e microorganismos “amigos” e “inimigos” (semelhantes às interações simbióticas e patogênicas, respectivamente) iniciam uma série de respostas celulares dinâmicas na planta como reorganização do citoesqueleto, translocação de organelas, tráfico de vesículas, alterações na localização de proteínas subcelulares, produção de fitoalexinas, enzimas hidrolíticas, proteínas relacionadas à patogenicidade (PR), peroxidase, inibidores de proteases e a deposição de calose, lignina e hidroxiprolina na parede celular e a resposta de hipersensibilidade (HR) (Lindgreen *et al.*, 1992; Dangl e Jones, 2001; Staskawick, 2001; Lipka e Panstruga, 2005). A resposta de resistência é acompanhada pela HR, que é o mais potente mecanismo de defesa que a planta possui para contenção do avanço do patógeno. A HR é responsável pela morte celular no local da infecção, o alto acúmulo de compostos fenólicos e o reforço da parede celular das células próximas à área de morte celular, além da indução sistêmica de defesa prevenindo a infecção em outras regiões da planta. A HR só ocorre quando existe o reconhecimento do patógeno pela planta (Melchers e Stuiver, 2000). As bases bioquímicas da reação de HR não são inteiramente conhecidas, entretanto, sabe-se que a mesma tem função de limitar a expansão sistêmica do patógeno (Dorey *et al.*, 1998).

Semelhante ao sistema imunológico de mamíferos, as plantas possuem moléculas especiais que reconhecem os invasores e ativam seu sistema de defesa. O termo avirulência (*avr*) é definido para genes bacterianos que determinam o reconhecimento específico das bactérias por plantas que possuem os genes de resistência (R) correspondentes; tal interação é chamada de incompatível. Este reconhecimento leva à indução de reações de defesa que geralmente incluem a reação de HR (Morel e Dangl, 1997; Fritig *et al.*, 1998; Dangl e Jones, 2001). Na ausência do gene R ou o correspondente *avr*, o reconhecimento não ocorre e o patógeno infecta a planta, o que caracteriza uma interação compatível (Flor *et al.*, 1971; Fritig *et al.*, 1998; Staskawicz, 2001). Assim, o receptor de resistência possui duas funções: reconhecimento específico do patógeno e habilidade para sinalizar genes de resposta de defesa (Ellis *et al.*, 2000).

Apesar da grande diversidade de patógenos, os genes R codificam apenas cinco classes de proteínas. Dentre elas, a primeira classe, chamada “Nucleotide-Binding Site plus Leucine Rich Repeat” (NBS-LRR), é a mais estudada. Proteínas NBS-LRR apresentam uma seqüência de localização nuclear na região NB e variações no número de repetições de leucina na região LRR. Domínios semelhantes à NB e LRR são encontrados em diversas proteínas e funcionam como sítios de interação proteína-proteína, ligação de peptídeos-ligantes e interação proteína-carboidrato (Dangl e Jones, 2001; Belkhadir *et al.*, 2004). A recombinação interalélica e a conversão dos genes podem gerar consideráveis variações que explicam muitos dos dados de instabilidade dos genes de resistência (Michelmore e Meyers, 1998).

A família de proteínas NBS-LRR (1ª classe) é subdividida de acordo com a presença ou ausência da região N-terminal TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor), assim chamados por serem homólogos à domínios intracelulares sinalizadores das proteínas Toll de *Drosophila* e receptor de interleucina de mamíferos. As homologias entre reinos e similaridade na função de proteínas que contêm a região TIR sugerem que as mesmas podem estar envolvidas em vias de sinalizações comuns a muitos organismos, além de possivelmente terem uma ligação com processos celulares e vias de resistência fundamentais (Martin *et al.*, 2003; Torii, 2004; Hu *et al.*, 2005). A maioria das proteínas R que não possuem esse domínio apresenta uma região chamada “coiled-coil” (CC), também na região N-terminal. Esses domínios apresentam funções relacionadas com a resposta imune e transdução de sinal (Dangl e Jones, 2001).

As proteínas NBS-LRR também apresentam sítios de ligação de nucleotídeos necessários às ligações de ATP e GTP. Estudos de genética clássica mostram que grande parte dos genes

R é encontrada em “clusters” (grupos de genes) nos genomas de plantas. O rearranjo desses “clusters” pode ser crítico para a geração de modelos de resistência específica e recombinação gênica. O genoma de *Arabidopsis* é um exemplo da diversidade desses genes; nele foi verificada a existência de, aproximadamente, 100 genes contendo domínios TIR-NB-LRRs, um número surpreendentemente pequeno, para mediar o reconhecimento de inúmeras proteínas Avr ligantes (Marathe e Dinesh-Kumar, 2003; Meyers *et al.*, 2003). Como exemplo disso, o gene de resistência RPM1 de *Arabidopsis* reconhece dois genes *avr* não homólogos, *avrpm1* e *avrB*, porém esse “duplo reconhecimento” foi demonstrado em poucos casos (Dangl e Jones, 2001; Grant *et al.*, 1995).

A segunda classe de genes R inclui o gene *Pto* que codifica uma serina treonina kinase, que confere resistência à bactéria *P. syringae pv. tomato*, que contém o gene *avrPto*. A terceira classe inclui os genes R *Cf-2* e *Cf-9* de tomate. Ambos codificam receptores transmembranares com grandes domínios LRR citoplasmáticos. A quarta classe é representada pelo gene de arroz *Xa21*, que confere resistência ao patógeno bacteriano *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. *Xa21* codifica um receptor transmembranar com um domínio extracelular e um domínio intracelular serina-treonina kinase. A quinta classe inclui o gene *HMI* que confere resistência ao fungo *Cochliobolus carbonum*. *HMI* codifica uma redutase dependente de NADPH que inativa a toxina produzida pelo fungo. Este último gene é diferente dos outros citados devido a não dependência de um componente Avr na degradação da toxina por *HMI* (Dangl e Jones, 2001; Baker *et al.*, 1997).

Os genes *avr*, por sua vez, são diversos e codificam proteínas com baixa similaridade (exceto na família de genes *avrBs3/pthA* de *Xanthomonas*). Tais genes foram identificados em bactérias fitopatogênicas por induzirem uma resposta tipo HR em plantas não hospedeiras. Embora os genes *avr* proporcionem um efeito negativo na aptidão da bactéria como patógeno em plantas contendo genes R correspondentes, eles desempenham papel fundamental na virulência e conferem vantagem seletiva nas interações compatíveis (Lahaye e Bonas, 2001). Estes genes são encontrados essencialmente em plasmídeos e sua transferência para cepas adaptadas a uma determinada hospedeira pode gerar avirulência se detectado pelo sistema de defesa da planta (Brunings e Gabriel, 2003; Chan e Goodwin, 1999; Gabriel, 1999b).

Foi demonstrado inicialmente por Flor *et al.* (1971) que o reconhecimento do patógeno pela planta ocorre através da existência de interações “gene a gene” que é um modelo de receptor-

ligante onde os produtos dos genes de resistência (R) atuam como receptores que detectam os genes correspondentes de avirulência (*avr*) (Ellis *et al.*, 2000). Um exemplo desse tipo de interação foi demonstrada entre a proteína quinase Pto de tomate e *avrPto* de *Pseudomonas syringae* em leveduras (Tang *et al.*, 1996). Porém, estudos têm demonstrado que esse tipo de interação não é comum (Xia, 2004). Pto também confere resistência na planta através da interação do produto do gene *Prf* que é um alvo de *avrPto* e, desse modo, há uma interação indireta entre o gene R e Avr (revisado por Kjemtrup *et al.*, 2000, Mysore *et al.*, 2002). Para tanto, outro modelo, chamado de “guard model” foi criado para explicar como interações indiretas entre proteínas da bactéria e da planta mediarão a HR. Neste, proteínas Avr interagem e ou modificam proteínas alvos no hospedeiro. Tais proteínas estão envolvidas em processos fisiológicos importantes e a modificação causada pela proteína Avr pode suprimir o mecanismo de defesa basal do hospedeiro criando um ambiente favorável para o patógeno. Esses alvos também podem incluir componentes de defesa ou proteínas da planta que podem ter suas funções modificadas a fim de nutrir o meio extracelular da colônia bacteriana (revisado por Xia, 2004; Dangl e Jones, 2001). O mesmo ocorre durante a interação entre *Arabidopsis thaliana* e o patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*), que coloniza o espaço apoplástico (extracelular) das folhas e causa a doença crestamento bacteriano aureolado (“haloblight”) em feijão. O gene R PBS1 de *A. thaliana* é o alvo de *avrPphb* de *Psp*. Tal efector cliva PBS1, e essa hidrólise é detectada pelo gene R RPS5 que inicia a via de sinalização de defesa. Desse modo o efector AvrPphB é detectado indiretamente através da hidrólise proteolítica de PBS1 (Shao *et al.*, 2003; revisado por Xia, 2004). Portanto, no caso de existirem proteínas R correspondentes (planta resistente), chamadas de guardiãs, as interações alvo-Avr são detectadas e a resposta de defesa é iniciada. Na ausência da proteína R específica, o alvo do hospedeiro não será “guardado” e o reconhecimento não ocorrerá, resultando no desenvolvimento da doença (Dangl e Jones, 2001; Lahaye e Bonas, 2001).

A grande implicação desse novo modelo frente a estratégias de obtenção de plantas transgênicas resistentes a bactérias é que a transferência de genes R entre espécies pode não ser suficiente se os respectivos alvos dos genes *avr* não estiverem também presentes. Portanto, a transferência de genes R entre espécies relacionadas pode ser mais realístico; por exemplo, genes R de tabaco podem funcionar em tomate mas não em *Arabidopsis* ou arroz (Marathe e Dinesh-Kumar, 2003).

Outros genes que também são responsáveis pelo desenvolvimento de uma HR e que controlam a habilidade fitopatogênica da bactéria para infectar a planta são denominados Hrp (hypersensitive response and pathogenecity) (Lindgreen *et al.*, 1986). Esses genes estão organizados em “clusters” e são encontrados em todos gêneros principais de bactérias fitopatogênicas gram-negativas, incluindo *Xac*, e codificam um especializado sistema de transporte de proteínas chamado Sistema de Secreção Tipo III (Type Three Secretion System – SST III). Esse sistema é conservado em bactérias patogênicas de plantas e animais, sendo responsável pelo transporte de proteínas efetoras para o interior da célula hospedeira (Lahaye e Bonas, 2001; Revisado por Büttner e Bonas, 2002). Além dessas proteínas, o sistema secretório tipo III de fitopatógenos bacterianos é capaz de secretar harpinas, pilinas e outras proteínas (Figura 3; Alfano e Collmer, 1997). Essas bactérias também transferem ácidos nucleicos e complexos protéicos durante a conjugação bacteriana através do SST IV (Type Four Secretion System) (Christie e Vogel, 2000).

1.4 - Estudos relacionados a patogenicidade de *Xanthomonas* sp.

O gênero *Xanthomonas* compreende patógenos bacterianos que infectam uma variedade de plantas economicamente importantes como citros, arroz, algodão, uva e feijão (Swings e Civerolo, 1993). Membros desse grupo causam doença em 124 monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas (Chan e Goodwin, 1999).

Efetores de virulência/avirulência são secretados por bactérias fitopatogênicas gram negativas e injetados na célula da planta através do SST III (Hueck, 1998; Lahaye e Bonas, 2001; Chang *et al.*, 2004). Um grande número de proteínas efetoras já foi descrito, incluindo membros da família AvrBs3/PthA, presente em todas as *Xanthomonas* patogênicas a plantas economicamente importantes como tomate, algodão, pimentão, arroz e citros (Gabriel, 1999a). Membros dessa família apresentam 90-97% de identidade entre si e desempenham um papel fundamental na patogenicidade (Swarup *et al.*, 1992; Lahaye e Bonas, 2001). A principal característica que deve ser ressaltada à respeito dessa família de proteínas é a presença de uma região central composta de 7,5 a 25,5 repetições, em “tandem”, de 34 aminoácidos. Mudanças no número e na seqüência das repetições de tais genes demonstraram novos modelos de especificidades indicando que as plantas possuem um enorme repertório de reconhecimento e de resposta à determinantes bacterianos (Bonas e Arckerveken, 1999; Yang *et al.*, 2000). As

regiões amino (N-terminal) e carboxi terminais (C-terminal) das proteínas que compõe esta família são altamente conservadas (Ballvora *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 1998). O C-terminal das mesmas contém domínios de localização nuclear funcional (NLS) e um domínio ácido de ativação da transcrição (AAD) (Lahaye e Bonas, 2001). Os domínios NLS são necessários para função de virulência do efetor quando transportados pelo sistema secretório tipo III e para localização nuclear (Yang e Gabriel, 1995b; Van den Arckerveken *et al.*, 1996). Os domínios AAD sugerem que estas proteínas apresentam uma função como ativadores transcricionais na planta (Yang *et al.*, 2000).

Em *Xanthomonas*, o gene *avr* melhor caracterizado é o *avrBs3* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*), agente causal da doença “mancha bacteriana” em pimentão e tomate. O produto do gene *avrBs3* é reconhecido especificamente em plantas que apresentam o gene *Bs3* (resistentes), resultando na indução de HR (Minsavage *et al.*, 1990; Bonas *et al.*, 1989). Porém a proteína AvrBs3 age como fator de virulência em plantas susceptíveis de tomate e pimentão induzindo sintomas de hipertrofia (Marois *et al.*, 2002).

Uma vez dentro da célula da planta, AvrBs3 é localizado no núcleo (Szurek *et al.*, 2002) e esse transporte é mediado pela proteína α -importina que compõe parte da maquinaria de transporte nuclear em células eucarióticas. Essa interação é dependente da região NLS de AvrBs3 (Szurek *et al.*, 2001) e induz mudanças nos padrões de expressão gênica da planta (Marois *et al.*, 2002). Alguns dos genes que são ativados por AvrBs3 codificam proteínas homólogas à α -expansinas, pectato liases e proteínas induzidas por auxinas, as quais podem estar envolvidas na hipertrofia das células do mesófilo que ocorre em plantas susceptíveis (Marois *et al.*, 2002). Desse modo, a indução de hipertrofia é dependente da região repetitiva (central), do domínio de localização nuclear (NLS) e do domínio de ativação da transcrição (AAD) de AvrBs3. Esse dados sugerem, portanto, que o efetor modula a transcrição no hospedeiro e provavelmente deve atuar como um fator de transcrição (Figura 3; Cornelis e van Gijsegem, 2000; Gürlebeck *et al.*, 2005).

Experimentos de duplo-híbrido em leveduras revelaram que AvrBs3 forma homodímeros “in vivo”, esta interação também foi comprovada “in vitro” através de experimentos de GST “pull-down assay”. Através da expressão de diferentes formas truncadas de *avrBs3*, mediada por agroinfiltração em plantas de pimentão, demonstrou-se que o efetor é translocado pelo SST

tipo III de *Xcv* e dimeriza-se no citoplasma da célula vegetal sem a necessidade de qualquer outra proteína da bactéria, sendo a região repetitiva LRR essencial e suficiente para essa interação. Além disso, no dímero, é necessário apenas um domínio NLS para que o efetor seja transportado até o núcleo da célula hospedeira (Gürlebeck *et al.*, 2005). Provavelmente o efetor AvrBs3 seria translocado como um monômero pois o dímero seria muito grande para passar através do “complexo agulha” do sistema secretório tipo III, desse modo chaperones moleculares interagiriam como controladoras no processo de secreção de AvrBs3, uma vez demonstrada a interação física entre AvrBs3 e HpaB, uma proteína com características semelhantes à uma chaperona do SST tipo III (Büttner *et al.*, 2004).

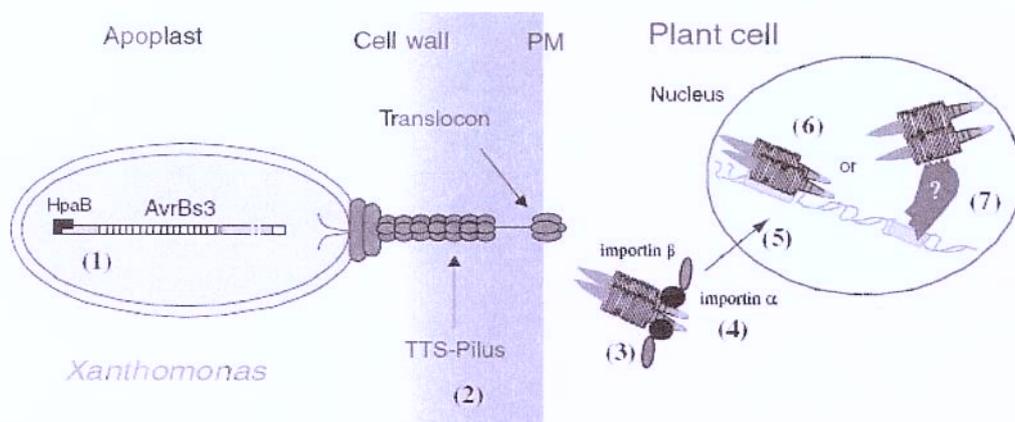


Figura 3. Modelo de translocação e interação entre a proteína AvrBs3 de *Xanthomonas vesicatoria* com alvos da célula hospedeira. AvrBs3 (1) é translocado da célula bacteriana para a célula vegetal pelo Sistema Secretório Tipo III (2) onde se dimeriza (3) e se associa às proteínas α e β -importina (4) para ser transportado para o núcleo (5). Sugere-se que no núcleo AvrBs3 transative a expressão de genes da planta ligando sequências regulatórias no DNA diretamente ou através de interações com outros fatores de transcrição do hospedeiro. (Extraído de Gürlebeck *et al.*, 2005).

A capacidade de formação de dímeros já foi demonstrada para vários reguladores transcricionais eucarióticos (Landschulz *et al.*, 1988; Riechmann e Ratcliffe, 2000) e AvrBs3 apresenta características comuns quando comparado com esses fatores de transcrição, pois possui uma região de localização nuclear (NLS) (Szurek *et al.*, 2002; Van den Arckerveken *et al.*, 1996), uma região AAD (Szurek *et al.*, 2001; Marois *et al.*, 2002) e apresenta características comuns com fatores bZIP que oligomerizam-se via repetições de zíper de leucina. Membros da família AvrBs3 possuem motivos imperfeitos de zíper de leucinas, presentes na região repetitiva (Gabriel, 1999a). Portanto, a habilidade para a formação de complexos diméricos na célula da

planta, sua importação para o núcleo, a necessidade do domínio AAD e a atividade de indução de genes da planta suporta a idéia de que AvrBs3 e proteínas homólogas agem como ativadores de transcrição nas hospedeiras (Gürlebeck *et al.*, 2005).

1.5 - Estudos relacionados a patogenicidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Embora os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade de *Xac* em citros não sejam inteiramente conhecidos, há várias evidências de que a proteína PthA (homóloga à AvrBs3) desempenha um papel central no desenvolvimento dos sintomas do cancro. Na verdade, o gene *pthA* foi um dos primeiros genes *avr* para o qual se demonstrou uma função no desenvolvimento dos sintomas no hospedeiro. Quando expresso transitoriamente em folhas de citros é suficiente para causar lesões tipo cancro, incluindo ruptura da epiderme, indicando que a proteína PthA é o fator principal de indução de hipertrofia celular e hiperplasia em citros (Swarup *et al.*, 1991; Duan *et al.*, 1999). A expressão transitória de PthA em plantas não hospedeiras como tabaco, feijão e algodão levam a formação de uma reação tipo HR (Duan *et al.*, 1999). De maneira semelhante, quando *pthA* foi inserido nas cepas *X. phaseoli* e *X. campestris* pv. *malvacearum*, os transformantes permaneceram não patogênicos aos citros, entretanto foi observado HR em feijão e algodão (Swarup *et al.*, 1992). Portanto, dada a alta identidade da seqüência de aminoácidos entre PthA e AvrBs3 (aproximadamente 97%) e suas atividades de indução de hipertrofia em plantas, considera-se que PthA também atue como fator de transcrição em citros alterando a expressão gênica na hospedeira.

Xac apresenta quatro isoformas de proteínas PthA, cujos genes estão localizados em dois plasmídeos nativos, pXAC33 e pXAC64 (Da Silva *et al.*, 2002). O gene *pthA1*, representado na Figura 4, apresenta 16,5 repetições de 34 aminoácidos no domínio central, uma repetição a menos que *pthA4* (mesmo que *pthA* descrito por Swarup *et al.*, 1991) e uma repetição a mais que *pthA2* e *pthA3*. Os genes *pthAs* são expressos de forma constitutiva na bactéria, sendo observados os mesmos padrões de expressão para as 4 isoformas em linhagens *Xac* 306, crescidas em meios de cultura NB e XVM2 (meio de indução de genes *hrps*) (Monge-Astua *et al.*, 2004). Portanto não há dependência de fatores da planta para a expressão destes genes na bactéria (Knoop *et al.*, 1991; Monge-Astua *et al.*, 2004). Do mesmo modo, *avrBs3* também é expresso de forma constitutiva, ao contrário de outros genes *avr* de *Xcv* os quais necessitam da planta ou crescimento da bactéria em meio mínimo para sua expressão (Knoop *et al.*, 1991).

Contrastando com essas evidências, a ativação do sistema secretório tipo III requer a adesão da bactéria à célula vegetal, que é normalmente mediada por estruturas tipo fímbria ou pili (Kang *et al.*, 2002).

```

MDP I R S R T P S P A R E L L P G P Q F D G V Q P T A D R G V S P P A G G
P L D G L P A R R T M S R T R L P S P P A P S P A F S A G S F S D L L R Q F
D P S L F N T S L F D S L P F P G A H H T E A A T G E W D E V Q S G L R A A
D A P P P T M R V A V T A A R P P R A K P A P R R R A A Q P S D A S P A A Q
V D L R T L G Y S Q Q Q Q E K I K P K V R S T V A Q H H E A L V G H G F T H
A H I V A L S Q R P A A L G T V A V K Y Q D M I A A L P E A T H E A I V G V
G K Q W S G A R A L E A L L T V A G S L R G P P L Q L D T G Q L L K I A K R
G G V I A V E A V Y A W R N A L T G A P L N
L T P E Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P D Q V V A I A S N . G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P A Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P A Q V V A I A S N . G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P A Q V V A I A S N . G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P A Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S N . G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P A Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S N . G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P A Q V V A I A S N I G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S H D G G K Q A L E T V Q R L L P V L C Q A H G
L T P E Q V V A I A S N G G G R P A L E
S I V A Q L S R P D P A L A A L T N D H L V A L A C L G G R P A L D A V K K
G L P H A P A L I K R T N R R I P E R T S H E R V A D H A Q V V R V L G F P Q
C H S H P A Q A F D D A M T Q F G M S R H G L L Q L F R R V G V T E L E A R
S G T L P P A S Q R W D R I L Q A S G M K R A K P S P T S T Q T P D Q A S L
H A F A D S L E R D L D A P S P T H E G D Q R R A S S R K R S R S D R A V T
G P S A Q Q S F E V R V P E Q R D A L H L P L S W R V K R P R T S I G G G L
P D F G T P T A A D L A A S S T V M R E Q D E D P F A G A A D D F P A F N E
E E L A W L M E L L P Q

```

Figura 4. Estrutura primária de PthA1 mostrando os três domínios principais da proteína. A porção N-terminal é necessária para a transferência da proteína pelo sistema secretório tipo III; a região central compreende 16,5 repetições de 34 resíduos ricos em leucina (cinza) que podem desempenhar um papel importante em interações proteína-proteína, assim como as cisteínas (negrito); o domínio C-terminal apresenta vários sinais de localização nuclear (negrito) além conter uma região ácida característica de fator de transcrição (sublinhado).

Genes homólogos a *pthA* são essenciais para a indução dos sintomas do cancro e estão presentes em todas as *Xanthomonas* que induzem cancro em citros, incluindo *pthB* e *pthC*, provenientes de *Xaa* patotipos B e C, respectivamente e *pthW*, originário de *Xac*, isolado A^w (Brunings e Gabriel, 2003). Genes *pthAs* são determinantes da formação do cancro que causa ruptura da epiderme foliar e conseqüentemente liberação da bactéria na superfície da folha. Portanto, *pthA* e homólogos são considerados fatores de dispersão da bactéria (Yang *et al.*, 1994; Brunings e Gabriel, 2003).

Como descrito, o cancro cítrico é uma doença que causa prejuízos não só no Brasil, mas em todo o mundo. As informações existentes são baseadas em modelos de infecção de patógenos que possuem efetores da família de genes *avrBs3/ pthA* mas não são conhecidas as interações moleculares que ocorrem na laranja em resposta especificamente à infecção por *Xac*. Portanto, a

identificação de genes diferencialmente expressos em plantas de (laranja Pêra) *Citrus sinensis* infectadas com *Xac* poderiam revelar tanto alvos específicos do gene *pthA* quanto quais vias da planta seriam ativadas quando há infecção pelo patógeno. Essas informações levariam, portanto, a um melhor entendimento das interações que ocorrem entre *Xac* e citros.

BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE
COLEÇÃO
UNICAMP

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo pretende identificar genes diferencialmente expressos em plantas de laranjas (*Citrus sinensis*) em resposta à infecção pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*).

2.2. Objetivos Específicos

- Geração de bibliotecas de folhas de *Citrus sinensis* infiltradas com H₂O e *Xac*, através da técnica de Hibridação Subtrativa Suprimida (SSH);
- Análise dos clones gerados pelas bibliotecas através da técnica de dot blot;
- Confirmação da expressão diferencial dos clones por Northern blot e PCR em tempo real (qPCR);
- Análise da expressão dos clones diferenciais pela técnica de PCR em tempo real nos tratamentos *Xac*, *Xaa* e H₂O após 48 horas e 10 dias após infiltração;
- Clonagem, expressão e purificação do domínio C-terminal do gene *pthA* para ensaios de cristalização;
- Experimentos de agrotransfecção do gene *pthA* em folhas de citros para análise da expressão gênica dependente da proteína PthA.

3. Material e Método

3.1 - Material Biológico

As bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* isolado 1421, e *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (*Xaa*), isolado 434 (patotipo C) foram gentilmente cedidas pelo pesquisador Júlio Rodrigues Neto, a partir da Coleção de Culturas de Fitobactérias da Seção de Fitobacteriologia do Instituto Biológico (IBSBF) do Centro Experimental de Campinas. O isolado 306 de *Xac* foi gentilmente cedido pela Dra. Yoko Bomura Rosato da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

As mudas de laranjas Pera Rio, Hamlin e Valência (*Citrus sinensis*) e limão Galego (*Citrus aurantifolia*), com idade entre 4 a 6 meses e certificadas como livre de patógenos, foram obtidas de viveiros da região de Limeira, mantidas em casa de vegetação e acondicionadas em sala de crescimento equipada com luz branca fluorescente, sob condições controladas de fotoperíodo (14 h de luz) e temperatura (28°C). Os experimentos de inoculação em condições de casa-de-vegetação foram realizados na Sessão de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, Estação Experimental de Campinas (IBSBF), sob a supervisão do pesquisador Júlio Rodrigues Neto, uma vez que esta Instituição está autorizada pela Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo a realizar testes com as bactérias *Xac* e *Xaa*.

3.2 - Inoculação das folhas

Vários experimentos foram realizados a fim de se padronizar a metodologia de inoculação da bactéria e avaliar os sintomas do cancro obtidos em condições de sala de crescimento e casa de vegetação. Duas cepas de *Xac* foram testadas: o isolado 306, cujo genoma foi sequenciado (da Silva *et al.*, 2002) e o isolado 1421, da coleção IBSBF, tido como mais virulento que o isolado 306 (Júlio Rodrigues Neto, comunicação pessoal), usado como controle para infecção.

Uma curva de crescimento da cepa 306 crescida em meio LB sem sal (Luria Bertani - triptona 10,0 g/L; extrato de levedura) a 30°C foi feita para verificar a fase exponencial de crescimento da bactéria que ficou entre OD_{600nm} 0.4 a 1.8. Uma estimativa do número de células por mL de suspensão de bactéria foi então realizada, correlacionando-se densidade ótica medida à 600 nm versus o número de bactérias contadas através de diluições seriadas. Para tanto, uma colônia de bactéria foi inoculada em meio LB sem sal e crescida em *shaker* sob agitação constante de 200 rpm à 30° C. Após 30 horas, suspensões bacterianas com OD_{600nm} =

0,6 foram diluídas (série 10 x) e posteriormente plaqueadas em meio LB sem sal. Após 48 horas de crescimento à 30° C, contou-se o número de células. Foi assim estabelecido que 1 mL de uma suspensão de *Xac* com $OD_{600nm} = 0.6$ contém cerca de 10^9 células. As plantas foram então infectadas de acordo com os seguintes métodos de inoculação.

- **Método “pinprick”**

O método “pinprick” de inoculação consiste na aplicação de uma suspensão de bactérias (inóculo) sobre um pequeno furo feito na superfície da folha (Gottwald *et al.*, 1993). Assim, folhas de laranja Pêra, Hamlin e Valência foram perfuradas com uma agulha de insulina e sobre esse ferimento aplicados 20 μ L de uma suspensão bacteriana com $OD_{600nm} = 0.6$, crescidas em meio LB sem sal sob agitação (200 rpm) a 30°C. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e observadas diariamente para evolução dos sintomas do cancro.

Testamos um pré-cultivo da cepa 306 na presença de pedaços de folhas de laranja para analisarmos a velocidade do desenvolvimento dos sintomas. Para tanto, uma colônia de *Xac* foi inoculada em meio líquido LB sem sal, a 200 rpm a 30°C até atingir $OD_{600nm} = 0.2$. O inóculo foi então distribuído em frascos controles (não tratado) e em frascos contendo pedaços de folhas de cada variedade (tratados), anteriormente esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 10% por 5 minutos. Os frascos ficaram no shaker a 30° C, 200 rpm até atingirem $OD_{600nm} = 0.6$. Foi retirada uma alíquota de 2 mL de cada frasco, onde 1 mL foi centrifugado, os “pellets” (precipitado de células) ressuspensos em água estéril e o restante, em meio LB sem sal. De maneira semelhante ao descrita acima, as suspensões foram aplicadas sobre os ferimentos na superfície das folhas, que foram monitoradas diariamente para a evolução dos sintomas do cancro.

- **Infiltração no mesófilo**

Suspensões bacterianas de pré-cultivos como descrito acima também foram usadas para a infiltração do mesófilo das folhas com auxílio de seringa hipodérmica, porém, nesses experimentos as duas cepas de *Xac* (306 e 1421) foram testadas. Para tanto, uma alíquota de 1 mL de cada pré-cultivo foi centrifugada e o “pellet” ressuspense em água milli-Q autoclavada para infiltração nas folhas. Com o auxílio de uma seringa hipodérmica, cada alíquota, tratada e não tratada de cada cepa e a respectiva variedade de citros, foi infiltrada em cada folha, paralelamente à nervura central.

Além disso, testaram-se inóculos provenientes de cultura líquida e suspensões obtidas de colônias crescidas por 48 horas em LB sem sal a 30°C. As plantas infiltradas foram mantidas em casa de vegetação e sala de crescimento. Após a análise dos resultados, as infiltrações que se seguiram foram a partir de suspensões de *Xac* crescidas em meio sólido por 48 horas.

3.3 - Extração do RNA

Folhas após 48 horas e 10 dias de infiltração com H₂O, *Xac* e *Xaa* foram coletadas e imediatamente congeladas em N₂ líquido para a extração do RNA total. Inicialmente foi utilizado o método do Trizol (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante. Posteriormente, o passo de precipitação por isopropanol foi substituído pela precipitação por LiCl 4M, segundo o protocolo Verwoerd *et al.* (1989), uma vez que foram obtidas amostras mais puras de RNA total. As folhas foram então coletadas, congeladas em N₂ líquido e maceradas resultando em aproximadamente 250 g de pó. Ao pó foram adicionados 8 mL de Trizol e incubou-se a suspensão à 80° C no banho por 5 minutos. Adicionou-se 1/3 do volume de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (8230xg, 4° C por 5 minutos) e a fase aquosa foi removida para um novo tubo contendo clorofórmio (1:1). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (18000xg, 4° C por 5 minutos) e ao sobrenadante adicionou-se 1 volume de LiCl 4M. Incubou-se à 4° C “overnight” (durante a noite). As amostras foram centrifugadas (8230xg, 4°C por 20 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi ressuspensionado em 300 µL de água tratada com DEPC (0,1% dietilpirocarbonato). Foram adicionados 30 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2 (NaOAc) e 3 vezes o volume de etanol absoluto. A solução foi homogeneizada e incubada durante 20 minutos a -20°C. Após foi realizada a centrifugação das amostras (18000xg, 4° C por 30 minutos), o sobrenadante foi novamente descartado e adicionado ao “pellet” 1 mL de etanol 70% gelado. Nesse passo o “pellet” foi descolado do tubo para uma eficiente lavagem e hidratação do mesmo. As amostras foram centrifugadas novamente (18000xg, 4°C por 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O “pellet” foi seco (30 minutos à 37° C) e ressuspensionado em ~ 50 µL de água tratada com DEPC e mantidos à -80° C. A partir do RNA total foi feita a extração do RNA mensageiro (mRNA) utilizando-se o Kit “Fast Track 2.0” (Invitrogen), segundo o protocolo do fabricante. A integridade dos RNAs foram verificadas

por eletroforese em gel de agarose com formaldeído e ou pela relação de absorvância 260/280nm (Sambrook e Russel, 2001). As amostras de mRNAs também foram mantidas a -80°C.

3.4 - Eletroforese em gel agarose

Para análise dos RNAs foram feitos géis de agarose com formaldeído (Sambrook e Russel, 2001) em tampão MOPS 1X (4,18g de MOPS, 0,656g de NaOAc, 0,372g de EDTA). O RNA total (~ 5 µg) foi denaturado à 65° C por 10 minutos na presença de 0,5X MOPS, 17,5% de formaldeído, 50% de formamida, 12 ng de brometo de etídio e 1X “loading buffer” RNA (Sambrook e Russel, 2001). Quando necessário, os RNAs foram transferidos para membranas de nylon para experimentos de Northern Blot, descritos a seguir.

Para a análise dos DNAs, foram feitos géis de agarose 0.8 – 1.0 % com tampão TAE 1X (40mM Tris Base, 5,7% NaOAc , 50mM EDTA pH 8,0) e o marcador utilizado em todos os géis de agarose os quais foram aplicados DNA foi o 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen).

3.5 - Hibridação Subtrativa Suprimida (SSH)

O método SSH compara duas populações de mRNA e obtém clones de genes que são expressos em uma população mas não na outra. Ambas populações de mRNA são convertidas em cDNA que contém transcritos específicos (expressos diferencialmente), chamados de “tester” e cDNA de referência, chamado “driver”. Ambos são hibridizados e as seqüências híbridas são removidas. Os cDNAs que não se hibridizaram representam genes que são expressos no cDNA “tester”, mas ausentes no cDNA “driver”. Para a realização das bibliotecas utilizamos apenas cDNAs de folhas infiltradas com H₂O ou *Xac*.

A partir de folhas com 10 dias após infiltração foram geradas bibliotecas subtraídas se utilizado o kit SSH da Clontech (k1804), de acordo com as instruções do fabricante, salvo alterações nos passos da transcrição reversa (RT) e PCRs primário e secundário. Para a transcrição reversa e sínteses da primeira e segunda fita de ambos cDNAs, utilizou-se o protocolo do kit Superscript (Invitrogen), utilizando-se 4,0 µg do RNA total 1 (folha infiltrada com *Xac*- “tester”) e 5,0 µg do RNA total 2 (controle infiltrado com H₂O- “driver”). O restante do método foi seguido de acordo com o manual do kit SSH da Clontech, porém foram feitas

alterações nos protocolos da 1ª e 2ª PCR. Desse modo, a 1ª PCR foi feita para um volume final de 25 µL, utilizando-se, 10 µM “primer” T7, 10X tampão, MgCl₂ (25mM), 5U/ µL Taq polimerase (Promega) e cDNA das amostras 1 e 2 subtraídas e não subtraídas. O programa utilizado no termociclador (Perkin-Elmer GeneAmp-9700) foi, 72°C por 5 minutos (extensão inicial), 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação inicial), 50°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 1 minuto e 30 segundos (extensão). A 2ª PCR foi feita utilizando-se 2 µL da 1ª PCR e o mesmo protocolo descrito acima, porém com os “primers” 10 mM Nested 1 e 2 do Kit SSH, excluindo-se o passo de extensão inicial de 72°C por 5 minutos. O produto da 2ª PCR foi purificado pelo Kit Wizard SV gel (Promega), segundo o protocolo do fabricante e acondicionado em freezer - 20°C.

3.6 - Clonagem e amplificação dos fragmentos gerados pela técnica SSH

3.6.1 - Preparação das células competentes

Foram preparadas células competentes para protocolos de eletroporação e transformação por PEG. Para a clonagem dos fragmentos gerados pela técnica de SSH, foram utilizadas células para eletroporação. Nos demais experimentos foram utilizados ambos protocolos de transformação.

- Eletroporação

As bactérias *E. coli*, cepa JM 109, foram preparadas segundo o protocolo para eletroporação (manual do usuário Gene Pulser BioRad), onde uma colônia isolada foi crescida em volume de 10 mL de meio LB durante a noite com agitação constante a 200 rpm, 37° C. O pré inóculo foi diluído (1:100) e crescido (200 rpm , 37° C) até atingir OD_{600nm}= 0.6. Todo o volume foi centrifugado a 4000xg, 4° C por 15 minutos e as células foram ressuspensas em 1 litro de água estéril gelada. Centrifugou-se (4000xg, 4° C, 15 minutos) novamente, para a ressuspensão das células em 500 mL de água estéril autoclavada gelada e, em seguida, realizada nova centrifugação (4000xg, 4°C, 15 minutos). O precipitado foi então ressuspenso em 3 mL de glicerol 10% e alíquotas de 60 µl foram transferidas para tubos eppendorff de 1,5 mL e estocadas a uma temperatura de -80°C.

- PEG

Inoculou-se uma colônia isolada de *E. coli* JM109 em 5 ml de meio LB à 37° C por 16 hs a 200 rpm. Em seguida, o pré-inóculo foi diluído 1:100 em 10 ml de LB . A cultura de 10 ml permaneceu a 37° C sob agitação (200 rpm) até atingir uma OD_{600nm} ~ 0.4. Transferiu-se esta cultura para um novo frasco estéril contendo 40 ml de LB e esta cultura de 50 ml foi crescida até atingir uma OD_{600nm} ~ 0.5. Posteriormente, a cultura foi transferida para um novo frasco estéril contendo 200 ml de LB até atingir uma OD_{600nm} ~ 0.6. A partir desta etapa, a cultura foi imediatamente resfriada e as células mantidas sempre em banho de gelo. A cultura resfriada foi transferida para garrafas, também resfriadas a 4° C, e centrifugada a 13000xg por 15 minutos a 4° C. O precipitado de células foi ressuscitado cuidadosamente em 100 mL da solução TBF1 gelado (0,03 M de KOAc, 0,05 M de MnCl₂, 0,10 M de KCl, 0,01M de CaCl₂ e glicerol 15%) e centrifugado a 13000xg por 4 minutos a 4° C em garrafas pré-resfriadas em banho de gelo. O precipitado de células foi ressuscitado gentilmente em 10 mL de TBF2 (0,010M de MOPS (pH 7,0), 0,075 M de CaCl₂, 0,010 M de KCl e glicerol 15%) gelado. As células foram aliqüotadas (100 µl) em microtubos de 1,5 mL pré-resfriados em banho de gelo. As aliqüotas foram estocadas a -80° C.

3.6.2 - Transformação das bactérias e clonagem dos fragmentos

Tabela 2. “Primers” utilizados nos experimentos desenvolvidos durante o projeto:

“Primer”	Seqüência
SP6	5´ ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3´
T7	5´ ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA 3´
M13F	CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG
M13R	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG
PthAN2	5´ CAT ATG GCG TTG ACC AAC GAC CAC 3´
PthA C	5´ GAA TTC TCA CTG AGG CAA TAG CTC 3´
PthA 1	5´-GGTATGCCATATGGATCCC-3´
PthA 2	5´-TGGAATTCCTGAGGCAATAGCT-3´
EGFP R	5´ CCT CCT TGA AGT CGA TGC 3´
Adaptador Sac I	TCG AAG CT

- Transformação por Eletroporação

Os fragmentos gerados pela técnica de SSH foram ligados no vetor pGEM-T easy (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. As bactérias *E. coli* cepa JM109 foram transformadas com o produto da ligação, pela técnica de eletroporação (Sambrook e

Russel, 2001). Todo o volume de cada ligação foi adicionado ao tubo contendo as células competentes (60µl) e transferido para a cubeta do eletroporador, que recebeu um pulso de voltagem 2,5kV. O volume foi transferido para microtubos de 1,5 mL contendo 800 µl de meio LB os quais foram incubados à 37° C por 1 hora. As células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (150ug/mL) e 20 µl de X-gal (40µg/mL) para seleção dos clones positivos. Foram coletadas 1000 colônias de cada biblioteca, que foram crescidas em placas de 96 “wells” contendo meio LB e antibiótico ampicilina (100mg/mL).

A partir dos inóculos, foram feitas tentativas de otimização de PCRs de colônia com os “primers” Nested 1 e 2 (integrantes do kit de SSH da Clontec) e os “primers” universais T7 e SP6, M13 forward e M13 reverse. Para tanto foram escolhidas de forma aleatória 13 amostras de cada placa de 96 “wells” como moldes para a realização das PCRs. As reações foram aplicadas em gel agarose 1,5% TAE para a verificação da amplificação dos fragmentos. Somente as placas que apresentaram 100% de amplificação das reações foram usadas para as etapas seguintes. Foi adicionado glicerol (concentração final de 20%) aos inóculos das placas para criopreservação das amostras em freezer -80°C.

Semelhante à técnica de “Differential Display” (Liang e Pardee, 1992), foram realizados PCRs com “primers” OPP (Operon Technologies) (possuem 10 nucleotídeos que anelam aleatoriamente nas seqüências alvos) para a observação de diferenças nas amplificações das amostras da primeira fita de cDNA da transcrição reversa (TR) dos mRNAs de folhas infiltradas com *Xac* e H₂O.

- Transformação por PEG

O produto da ligação foi adicionado ao tampão “transfo buffer” (KCM 10X, PEG 10%) para posteriormente serem adicionados às células competentes as quais foram previamente descongeladas no gelo. Incubou-se a mistura por 30 minutos no gelo e posteriormente foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Foi então adicionado 1 mL de LB e incubou-se a 37°C sob agitação (200 rpm) por 50 minutos. A amostra foi centrifugada e foi retirado 700 µL do sobrenadante. O “pellet” foi ressuscitado e todo o volume foi plaqueado em placas contendo meio LB-ágar com os antibióticos específicos.

3.7 - Dot e Northern Blot

Para os experimentos de dot blot foram feitas soluções com adição do corante bromofenol blue e razão 1:1 - PCR/NaOH para a denaturação dos fragmentos amplificados. Foram aplicados 0,5 µL dessa solução em membranas de nylon Hybond N⁺, monitoradas com a visualização do corante. Em uma mesma membrana foram espotados em duplicata os produtos de PCR de duas placas de 96 “wells” das bibliotecas. Para cada, fez-se uma réplica da mesma para a hibridação com sondas diferentes, ou seja, foi obtida uma membrana para a sonda proveniente da planta não infectada e outra para a planta infectada. Após a aplicação, as membranas foram colocadas na luz UV para a secagem e fixação das amostras (Sambrook e Russel, 2001).

Aplicaram-se nas membranas os PCRs gerados pelos “primers” M13F e R e “primers” Nested 1 e 2. As sondas utilizadas para essas membranas foram produtos de transcrição reversa das folhas infectada (*Xac*) e sadia (H₂O), amostras de cDNA subtraído e digerido (para a retirada dos adaptadores) de ambas após 10 dias de infiltração e PCRs OPP. Para a marcação das sondas foi utilizado o Megaprime DNA Labelling System kit (Amersham Biosciences), segundo o protocolo do fabricante. Apenas as marcações com valores superiores a 1,0x10⁸ cpm/µg de DNA foram utilizadas. Após a revelação e análise comparativa da intensidade dos “spots”, separaram-se as amostras que apresentaram padrão diferencial para a confirmação pela técnica de Northern blot. (Sambrook e Russel, 2001).

3.8 – Seqüenciamento de DNA e buscas por homologia

As reações de seqüenciamento foram baseadas na técnica de Sanger *et al.* (1977). Para tanto, foi utilizado o kit de seqüenciamento DNA Sequencing kit Big DyeTM Terminator, de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante (Applied Biosystems). As amostras foram seqüenciadas no equipamento 377 ABI PRISM Genetic Analyser (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram usadas para a identificação dos cDNAs através da busca por homologias nos bancos de dados NR e de EST usando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Em geral, as seqüências derivadas dos clones isolados na análise diferencial identificaram ESTs de *C. sinensis* com “match” completo, os quais foram considerados como clones ESTs correspondentes. Tanto as seqüências de DNA derivadas dos clones isolados na análise diferencial como seus ESTs correspondentes foram usados na busca

em banco de dados usando-se a versão BlastX para a identificação da provável função dos genes.

3.9 – Reação de transcrição reversa

Foram utilizados 3-4 µg de RNA total e 1 µg de mRNA de folhas infiltradas com H₂O, *Xac* ou *Xaa* após 48 horas e 10 dias de infiltração para a obtenção dos cDNAs que foram utilizados nos experimentos de qPCR. Desse modo, para cada 1 µL de RNA total (3 µg) foram adicionados 2 µL de tampão 5x da DNase I (MOPS 5X – MgCl₂ 30 mM) e 1 µL de DNaseI (7,5 U/µL). O volume foi completado com água tratada com DEPC para 10 µL de volume final. As amostras foram incubadas à 37° C por 30 minutos. Foi feita a inativação da enzima à 80° C por 10 minutos. Após foi adicionado às amostras 2 µL de oligo DT (10 µM) e a mistura foi incubada à 68° C durante 5 minutos. Adicionaram-se à solução: 4 µL 5x tampão “first strand buffer”, 2 µL 0,1 M DTT, 2 µL 10mM dNTP’s e 0,5 µL da enzima “SuperScript II RT”. Incubou-se a mistura à 25° C por 5 minutos e 42° C por 50 minutos. A amostra foi denaturada à 70° C por 15 minutos para a inativação da enzima (Kit SuperScript - Invitrogen). Foram adicionados 20 µL de água tratada com DEPC nas amostras as quais foram armazenadas em freezer –20° C. Para a verificação da eficiência dos cDNAs gerados, foram feitas PCRs utilizando-se “primers” de genes diferenciais para a amplificação dos fragmentos específicos.

3.10 - PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

O padrão de expressão dos genes que apresentaram diferenciais nos Northern foram confirmados por qPCR. A detecção de amplificação em tempo real foi realizada no equipamento “7500 Real Time PCR System®” (Applied Biosystems) utilizando o reagente SyberGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems) que além de conter todos os reagentes necessários para a realização de uma PCR (dNTPs, MgCl, tampão, Taq Ampli-Gold), contém também o corante SYBRGreen, componente intercalante de DNA dupla fita, necessário para a detecção da reação ciclo a ciclo.

As seqüências de DNA dos genes diferenciais foram carregadas no programa “Primer Express 3.0” (Applied Biosystems) para a derivação dos oligos (detectores) usados nos experimentos de qPCR. As seqüências desses oligos estão mostradas na Tabela 3. Inicialmente,

foram feitas análises de quantificação absoluta de alguns genes através de amplificações obtidas variando-se a concentração de “primers” em diluições seriadas (logarítmicas) de cDNA para a determinação da melhor relação de concentração “primer”/cDNA, tentando-se obter > 90% de eficiência de amplificação do gene alvo e controle endógeno. Foram utilizados cDNAs gerados a partir de mRNAs e RNAs totais de folhas infiltradas com *Xac*, *Xaa* e H₂O após 48 horas e 10 dias de infecção. Em seguida, foram realizadas as reações para a quantificação da expressão pelo método “análise relativa dos dados”, que é expressa pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Foram utilizadas como amostras calibradoras os cDNAs de folhas infiltradas com H₂O. Utilizamos o EST CK937155 como controle endógeno das reações pois apresentou o mesmo nível de expressão nas amostras dos tratamentos: folhas infiltradas com *Xac*, *Xaa* e H₂O. As PCRs foram feitas em triplicata, em placas de 96 “wells” e os resultados foram analisados pelo programa “7500 Software” usando-se o modo “quantificação relativa” (Applied BioSystems).

Tabela 3: “Primers” gerados para amplificação dos clones diferenciais por qPCR.

Clone	“Primer” 5’	“Primer” 3’
1A-F2	CCTCAACATCATGGCGAAGTT	GCCACAACACAGTCCGCTAA
1A-B5	GAGTGGTACTTTTTGTCCCAAGAG	TGTCCTGTTTGGCCTTCCA
1A-F3	GCTGGCTCTGTAGTCTCCTGAAA	AGTTGGACAAGGGAGCAGTTCT
1A-C3	CCTGGAGCGGCAAGGAT	CCCAGCAGCCTCATGACCTA
1G-E6	TTTTTCAGCGCCAGTTAGTTAGAG	CGGCCATTTCCCAATTC
1A-H4	AAGGGCTTAACTCACGCATCA	CCCTTGTTGTTGCCATTGC
1A-D3	GCCAAATCCTTGCGAAGATG	AAGTTCCTTTTCGAGGCAAGTTT
1A-H3	AGGGACTCAAGTTTTTGGTATACA	GCCATGGTTGATGCTAAATCC
2I-B9	CGATATTGGAGGATGGAACCA	TTCCCAACATTCACATCCTTCA
2I-F12	CAACTCCTGGAGCCAACCAT	GGCCTGGCAGTATCAAACACA
2I-F9	CAGCAACAAGAAGAAGGAAAAGG	ACATCTGAGATCGCCAAATGC
2D-B12	GCCAGAATGATCACCATCGA	GCCGTGTCCAGATTTGG
2H-B9	CGGGAAGAGGGTTCGATATCA	CTGACACGTGGCCTTTGTTCT
2I-G12	TCACCTCGAGAGACGAAATCTG	TCATGATAGCAGGATTGGTGTCA
2E-B5	AAAACAGCCTCTGAACCAAATCTT	GGAGGAAATGTGAGAGGCATCT
2E-D10	TCCCTGAGAATACCCCTGACA	CCCTGGTAAGGCAGCAACTAA
2E-D12	CCTTTTGTTCCACACGAGATT	AAAAGATAACGCAGGTGTCTAAGA

3.11 – Clonagem e expressão do domínio C-terminal de PthA1 com cauda de histidina (cPthA1)

O domínio C-terminal de PthA1 foi amplificado por PCR (“primers” pthAN2 e pthAC) utilizando-se como molde o plasmídeo extraído de *Xac* 306. O fragmento esperado foi amplificado (~ 800 pb) e ligado ao vetor pGEM t-easy (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da ligação foi usado para a transformação de células competentes JM109 pela técnica de PEG (Sambrook e Russel, 2001) e os clones transformados foram clivados com as enzimas *EcoRI* e *NdeI* (Promega) para a liberação do fragmento correspondente ao domínio C-terminal. Essas digestões foram aplicadas em gel agarose 0,8% e os fragmentos foram então extraídos para serem ligados no vetor pET28a, também digerido com as mesmas enzimas de restrição. O produto da ligação foi utilizado para a transformação de células competentes *E. coli* JM109 por PEG e para a confirmação das clonagens foram feitas PCRs de colônia (Sambrook e Russel, 2001). A seqüência dos clones positivos foi verificada pela técnica de sequenciamento. Confirmadas as seqüências, os plasmídeos foram usados para a transformação (PEG) de células competentes BL21dE3 para expressão do domínio C-terminal.

A indução foi feita em 2,5 litros de meio LB, a partir da diluição de 1:100 do pré- inóculo contendo meio LB, antibiótico kanamicina (50 µg/mL) e o clone pET28a- cPthA1-BL21DE3. Os inóculos foram incubados à 30° C, sob agitação constante de 200 rpm até atingirem OD_{600nm} ~ 0,6. Nesse estágio, adicionou-se IPTG 0,4 M para a indução da proteína cPthA1. Após 3 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação e o “pellet” foi ressuspenso em tampão TS 10 (20mM Tris, 300 mM NaCl e 10 mM Imidazol). Foi adicionado ao extrato, 2 mL de lisozima (10mg/mL) e o mesmo foi incubado por 30 minutos no gelo. A lise das bactérias foi realizada por sonicação utilizando-se a potência de 50 W em pulsos de 30 segundos e mantidas em gelo até o clareamento da solução. A suspensão foi centrifugada a 4700xg por 15 minutos a 4° C e o “pellet” foi congelado para posterior purificação. A análise da indução do domínio C-terminal foi verificada por gel SDS page 10% (Sambrook e Russel, 2001).

3.12 - Purificação de cPthA1 por cromatografia de afinidade.

O sobrenadante, obtido por centrifugação do lisado de células que expressou cPthA1, foi filtrado em uma membrana de 0,45 µM e aplicado a uma resina de Ni-NTA (Quiagen)

previamente equilibrada com tampão TRIS-HCl 20mM pH 8,0 com 10mM imidazol, 300mM NaCl e 0,05mM DTT (TS10). A coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de tampão TRIS-HCl 20mM pH 8,0 com 10mM imidazol, 300mM NaCl, e 0,05 mM DTT e a proteína de interesse foi eluída com tampões com concentrações crescentes de imidazol (20 mM até 120 mM).

3.13 – Clonagem de pthAs 1, 2 e 4 em vetor pBI121 para experimentos de agroinfecção em folhas de laranja.

Plasmídeos de *Xac* foram purificados usando-se o kit Qiagen e usados como DNA “template” em reações de PCR: DNA “template” (~25 ng), 10 µM de cada “primer” PthA1 e PthA2, 240 µM dNTPs, 1x tampão da Taq Pfu Turbo e 1U Taq Pfu Turbo (Stratagene) em 50 µL de reação. As condições de PCR foram: 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 3 minutos. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose e os fragmentos em torno de 3 a 3.5 kb foram purificados do gel, digeridos com *NdeI* e *EcoRI* e subclonados em vetor pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas. O produto da ligação foi usado para transformar células eletrocompetentes de *E. Coli* JM109. Plasmídeos recombinantes foram identificados por sequenciamento e digestão com *SspI*, que diferencia os diferentes PthAs. Os genes *pthAs* clonados foram utilizados para a posterior clonagem em vetores pBI121 para experimentos de agroinfiltração.

A fim de observar a localização da proteína PthA na célula da planta nos experimentos de agroinfiltração, foram feitas construções com o gene EGFP que codifica a proteína GFP (Green Fluorescent Protein). Para tanto o gene EGFP foi removido do vetor pEGFP (BD-Clontech) com *SacI/NotI* e subclonado em fusão C-terminal com a proteína PthA2 em pET29a. A fusão PthA2-GFP foi removida do vetor pET29a com *XbaI* e *XhoI* e ligada no vetor pBI121 linearizado com *XbaI* e *SacI*, usando-se adaptadores *XhoI-SacI*. Os *pthAs* 1, 2 e 4, sem fusão com GFP foram também subclonados em vetor pBI121. Para tanto, os *pthAs* 1, 2 e 4 previamente clonados em pET29a foram removidos desse vetor com *XbaI* e *XhoI* e ligados no vetor pBI121 linearizado com *XbaI* e *SacI*, usando-se adaptadores *XhoI-SacI*. Os plasmídeos recombinantes foram seqüenciados e usados para transformar cepas de *Agrobacterium tumefaciens* C58, LBA4404 e EHA105 e GV3101 eletrocompetentes.

3.14 - Preparação e transformação de células eletrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* para agrotransfecção

As bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, cepas C58, LBA4404 e EHA105 e GV3101, foram preparadas segundo o protocolo para eletroporação (manual do usuário Gene Pulser BioRad). Para tanto, uma colônia isolada de cada cepa foi crescida durante a noite com agitação constante à 200 rpm, 30° C em um volume de 1,5 L de meio YEP, até atingir $OD_{600nm} \sim 0,6$. Os inóculos foram centrifugados (4000g, 4° C por 10 minutos) para a obtenção do “pellet”. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscendidas em 50 mL de solução estéril de 10% glicerol à 4° C. Repetiu-se o passo anterior duas vezes e após, o “pellet” foi ressuscendido em 25 mL de solução de glicerol 10% estéril. Todo o volume foi aliquoteado em tubos de 1,5 mL e armazenado em freezer -80° C.

A transformação das células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* foi baseada no protocolo de Sambrook e Russel (2001). As *Agrobacterium* transformadas foram crescidas com os antibióticos específicos, em meio YEP (10g/L peptona, 10g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl), sob agitação constante de 200 rpm, a 28°C, por 48 horas. Os inóculos de *Agrobacterium* foram coletados por centrifugação (4700xg por 5 minutos) e ressuscendidos em meio MS (Sigma), mantidos sob agitação constante de 200 rpm a 28°C durante 3h. Uma suspensão bacteriana de $OD_{600nm} \sim 0,3$ foi usada para infiltrar folhas de laranja. Folhas infiltradas foram observadas em estéreo-microscópio. Cortes de tecido fresco foram feitos com auxílio de bisturi e analisados em microscópio de fluorescência usando-se filtros para evidenciar fluorescência de GFP.

4. Resultados e Discussão

4.1 - Ensaio de infiltração nas folhas

Folhas de laranja doce das variedades Pêra, Hamlin e Valência inoculadas pelo método de “pin-prick” não apresentaram sintomas do cancro, apenas pequenas lesões que não se desenvolveram (dados não mostrados). Portanto, o método adotado para infecção das plantas foi a infiltração da bactéria no mesófilo.

Folhas infiltradas com as suspensões bacterianas crescidas em meio sólido durante 48 horas desenvolveram lesões características de cancro, em especial, hiperplasia e “encharcamento” (“water soaking”) do tecido, cerca de 5 dias após a infiltração, e a formação de pequenas pústulas cerca de 10 dias após a infiltração (Figura 5). Folhas infiltradas com a cepa 1421 apresentaram sintomas mais rapidamente que aquelas infiltradas com a cepa 306, porém, não foram observadas diferenças significativas na suscetibilidade entre as três variedades de laranja testadas.

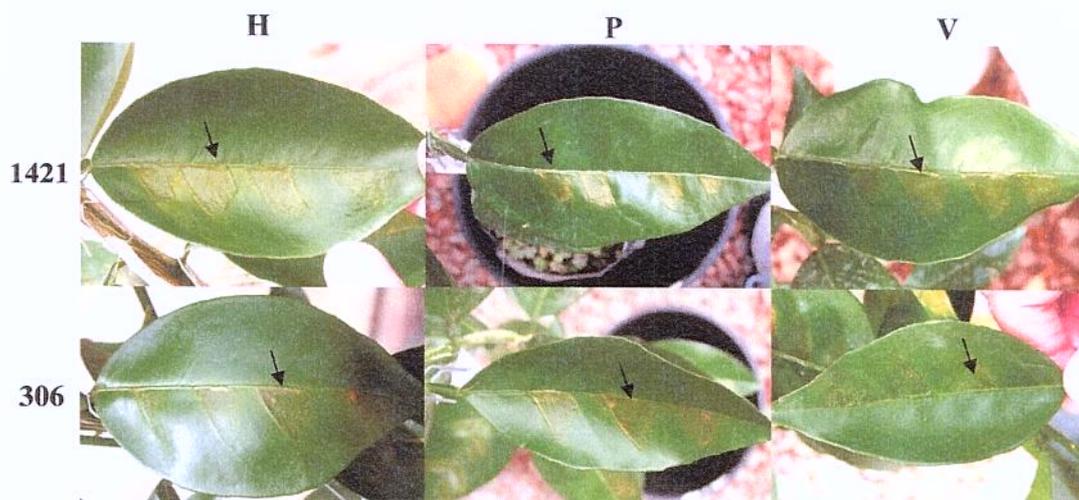


Figura 5. Folhas de laranja, variedades Hamlin (H), Pêra (P) e Valência (V), infiltradas com suspensão bacteriana (cepas 1421 e 306) a partir de meio sólido mostrando os sintomas desenvolvidos 10 dias após a infiltração da bactéria. Plantas mantidas em casa de vegetação. Setas indicam áreas infiltradas.

Segundo a literatura (Aldon *et al.*, 2000; Lahaye e Bonas, 2001; Büttner e Bonas, 2002, Fouts *et al.*, 2003), componentes da planta são necessários para a indução da expressão dos genes *hrps* e *avrS*, essenciais para a infecção. Assim, avaliou-se o efeito do pré-cultivo da

bactéria na presença de pedaços de folhas sobre o desenvolvimento dos sintomas. Os resultados demonstraram entretanto que não houve diferença significativa no grau ou no tempo de aparecimento dos sintomas do cancro nas folhas infiltradas com bactérias previamente “induzidas” ou controle (Figura 6).

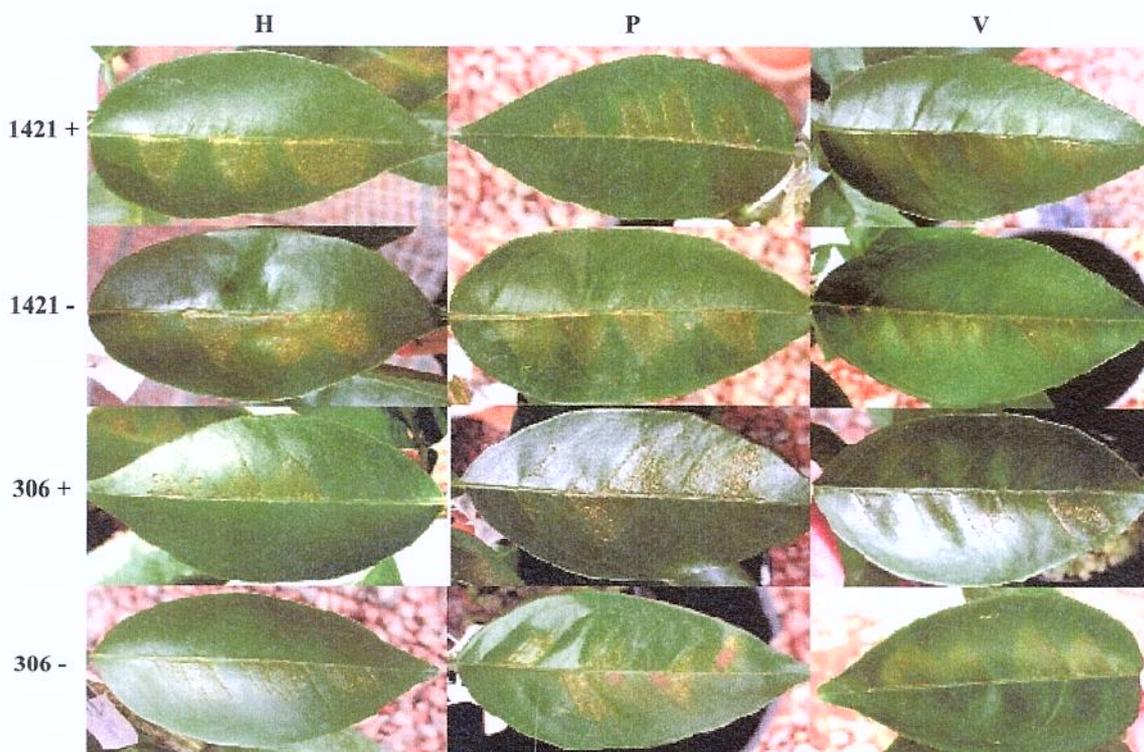


Figura 6. Folhas de laranja, variedades Hamlin (H), Pera (P) e Valência (V), infiltradas com suspensão bacteriana (Xac, cepas 1421 e 306) crescidas em meio líquido previamente incubadas (+) ou não (-) com pedaços de folhas das respectivas hospedeiras, mostrando os sintomas desenvolvidos 14 dias após a infiltração da bactéria. Plantas mantidas em casa de vegetação. Áreas mais claras representam áreas infiltradas.

O tempo de aparecimento dos primeiros sintomas do cancro (hipertrofia e hiperplasia), que variou de 4 a 5 dias após a infiltração, foi semelhante nas plantas mantidas em casa de vegetação e em sala de crescimento e entre as três variedades de laranja testadas. Após esse período, entretanto, as lesões evoluíram mais rapidamente nas plantas mantidas em casa de vegetação, em especial, o amarelecimento e posterior escurecimento das lesões. Por outro lado, observou-se uma taxa de abscisão foliar maior na condição de casa de vegetação, principalmente nas variedades Hamlin e Valência. Portanto, decidiu-se trabalhar com suspensão de bactérias a partir de meio sólido, com infiltrações paralelamente à nervura

central e manutenção das plantas em sala de crescimento usando-se a variedade de laranja Pêra aos 6 meses de idade. Apesar da cepa 1421 ser relativamente mais virulenta, os experimentos foram realizados com a cepa 306, uma vez que seu genoma é conhecido.

Os resultados obtidos nesses experimentos estão de acordo com os dados da literatura que mostram que os sintomas do cancro cítrico, incluindo hipertrofia celular, hiperplasia e “encharcamento” do tecido foliar tornam-se visíveis de 4 a 5 dias após a infiltração da bactéria (Brunings e Gabriel, 2003). Há evidências de que o reconhecimento entre células de algodão e *X. c. pv malvacearum* ocorre 48 horas após a inoculação da bactéria (Al-Mousawi *et al.*, 1982) e que *Xac* induz divisão celular em citros dentro de 72 horas após a sua inoculação (Lawson *et al.*, 1989). Portanto, com o objetivo de isolarmos genes envolvidos no desenvolvimento dos sintomas, foram geradas bibliotecas subtraídas ao redor do décimo dia após a inoculação da bactéria. Exemplos de dois estágios de desenvolvimento dos sintomas do cancro induzido por *Xac* ao terceiro e décimo dia após a infiltração da bactéria estão mostrados na Figura 7.

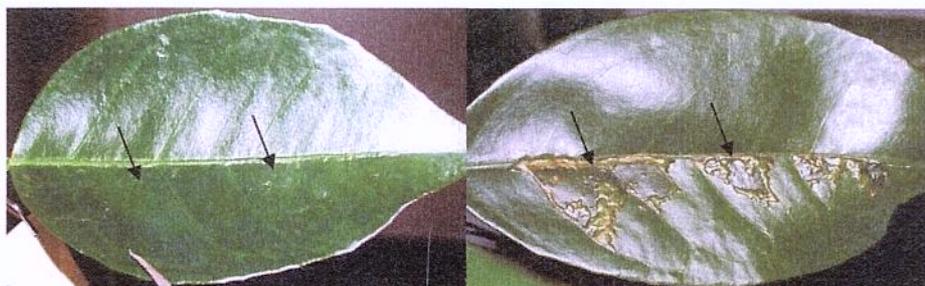


Figura 7. Folhas de laranja Pêra infiltradas com suspensão de *Xac* (306), mostrando os sintomas desenvolvidos ao terceiro dia (amarelecimento da área infiltrada; esquerda) e décimo dia (encharcamento e hiperplasia; direita) após a infiltração da bactéria. Setas indicam áreas infiltradas de folhas de plantas mantidas em sala de crescimento.

4.2 - Extração dos RNAs

Amostras de RNA total de folhas após 10 dias de infiltração foram utilizadas na construção da primeira biblioteca subtrativa. Exemplos de amostras de RNA total utilizados para obtenção dos mRNAs estão apresentados na Figura 8.



Figura 8. Gel de agarose 1%, MOPS 10X e formaldeído mostrando 4 uL dos RNAs extraídos após precipitação com LiCl 4M. 1 e 2, RNA de folhas não infiltradas; 3 e 4, RNA de folha infiltrada; C – RNA total de *Arabidopsis thaliana* usado como controle para verificar a integridade dos RNAs das amostras.

4.3 – Obtenção da Biblioteca Subtrativa – SSH

Apesar de a técnica SSH ser descrita como simples e eficiente para a geração de cDNAs altamente enriquecidos para genes de baixa e alta abundância expressos diferencialmente (Diatchenko *et al.*, 1996; Johnsson *et al.*, 2000), dificuldades foram encontradas para a geração das bibliotecas. Na primeira tentativa de utilização do kit SSH da Clontech não foi possível visualizar o cDNA “driver” em gel e a ligação dos adaptadores não foi eficiente. Supondo que algum dos componentes do kit não estava funcionando, decidiu-se fazer a síntese do cDNA usando o kit Superscript (Invitrogen). Dessa forma, o protocolo SSH foi repetido com algumas alterações: incubação da síntese da primeira fita foi a 37° C por 60 minutos e aumento do volume do produto da reação, facilitando as extrações com fenol/clorofórmio.

Vários PCRs foram feitos após a subtração dos cDNAs, entretanto, o “smear” esperado nos géis não foi observado. Para testar se havia cDNA após a subtração, foram feitos PCRs com “primers” aleatórios (10pb) da Operon. PCRs com tais “primers” geraram “smear” esperado, indicando que havia cDNA após a subtração e que as condições do PCR deveriam ser otimizadas. Desse modo, alterou-se a ciclagem do 1° PCR (material e métodos) e obteve-se um pequeno “smear” que se manteve após o 2° PCR feito com “primers” Nested (N) 1 e 2 (Figura 9).

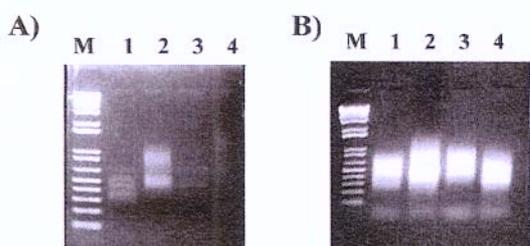


Figura 9. Gel agarose 1,5% mostrando “smear” correspondente a existência de cDNAs subtraídos e não subtraídos. Colunas 1 e 2: cDNA 1, subtraído e não subtraído; colunas 3 e 4: cDNA 2, subtraído e não subtraído. A) 1° PCR dos cDNAs após subtração feitos com o primer T7; B) PCR feito com primers nested 1 e 2 a partir do 1° PCR.

4.4 - Clonagem e amplificação dos fragmentos gerados pela técnica SSH

Os produtos do 2° PCR clonados em vetor pGEM-T resultaram em mais de 1000 colônias recombinantes de cada biblioteca. Foram feitos PCRs de colônia a partir de inóculos crescidos O/N com as duplas de “primers” N 1 e 2 e com os “primers” M13 reverso (R) e “forward” (F). A Figura 10 mostra o resultado da amplificação de clones da biblioteca *Xac* (“forward”) amplificados com os “primers” N1 e N2 indicando que apenas cerca de 23% dos clones apresentam adaptadores em suas extremidades. Na biblioteca reversa, o número de clones com adaptadores nas extremidades foi maior, cerca de ~ 69% (Figura 10).

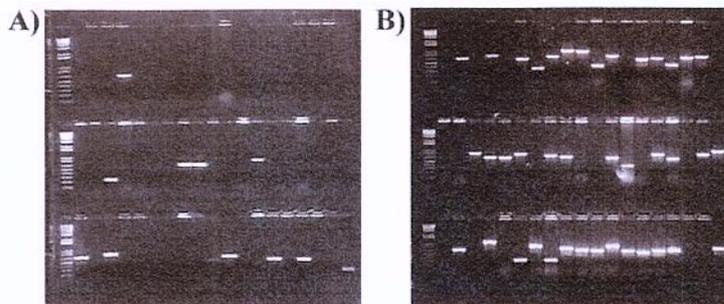


Figura 10. Exemplos de PCR de clones das bibliotecas “forward”, placa cDNA1-A (A) e reversa, placa cDNA2E (B) usando-se os primers N 1 e 2, mostrando o número de cDNAs obtidos com ambos adaptadores nas extremidades.

Quando as PCRs foram feitas usando-se os “primers” universais M13F e R, que anelam-se no “polylinker” do vetor pGEM-T, a maioria dos clones gerou produtos de PCR em ambas bibliotecas, indicando que os clones contêm insertos sem adaptadores em suas extremidades, ou seja, que ambas bibliotecas contêm clones não subtraídos (Figura 11).

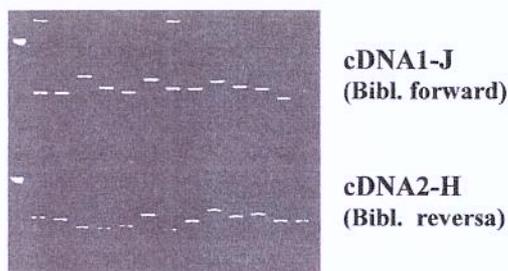


Figura 11. Gel de agarose 1,5% de amostras de PCR de colônia geradas com os primers M13F e R, das bibliotecas “forward” (placa cDNA1-J) e reversa (placa cDNA2-H). Foram aplicadas amostras aleatórias de cada placa.

Os produtos de PCR amplificados com os “primers” M13F/M13R foram “espotados” diretamente nas membranas pois a maioria das reações testadas em gel mostrou uma banda de amplificação (Figura 11). Porém, essas membranas, especialmente no caso da biblioteca *Xac*, contêm em sua maioria clones sem seqüências adaptadoras e que provavelmente não sofreram subtração. Mesmo assim, decidiu-se testar tais membranas uma vez que um número maior de clones (subtraídos e não subtraídos) seriam selecionados nos ensaios de hibridação.

Para gerar membranas apenas com os clones contendo adaptadores nas pontas, alíquotas dos produtos de PCR gerados com os “primers” N1/N2 foram analisados em gel de agarose e somente aqueles que amplificaram bandas foram aplicados nas membranas. Dessa forma, foram aplicados 21 clones da biblioteca forward (*Xac*) e 67 clones da biblioteca reversa (*H₂O*) em uma única membrana.

4.5 – Dot e Northern Blotting

A Figura 12 mostra o resultado das hibridações de clones das bibliotecas forward (*Xac*) e reversa (H_2O) gerados com “primers” N e M13, hibridizados com as respectivas sondas subtraídas ou com os produtos da transcrição reversa de mRNAs de folhas infiltradas com H_2O ou *Xac* para comparação. Ao contrário do esperado, não foram observadas diferenças marcantes no padrão de hibridação entre os clones das duas bibliotecas os quais deveriam ser diferenciados pelas respectivas sondas. Na Figura 12 A, por exemplo, os clones hibridizados com a sonda reversa (detecção de genes reprimidos por *Xac*) deveriam apresentar um número expressivo de clones positivos comparados aos clones hibridizados com a sonda forward (genes induzidos por *Xac*), e vice-versa.

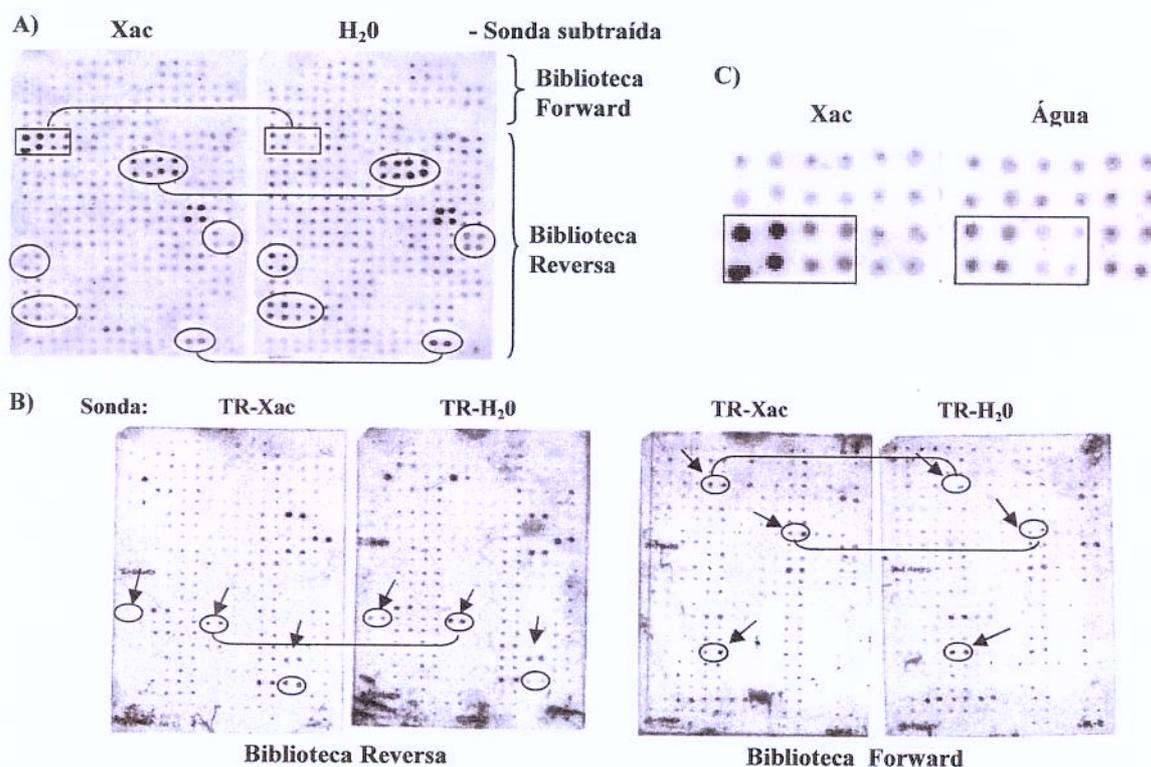


Figura 12. A) Clones das bibliotecas forward e reversa amplificados com primers N e hibridizados com as respectivas sondas subtraídas. Os balões e retângulos (conectados como exemplo) indicam os clones em réplicas que apresentaram padrão de hibridação diferencial com as sondas reversa e forward, respectivamente. B) Clones das bibliotecas forward e reversa amplificados com primers M13 e hibridizados com sondas geradas por transcrição reversa de mRNAs extraídos de folhas infiltradas com *Xac* ou H_2O . As setas indicam clones em réplicas que apresentaram padrão de hibridação diferencial entre as sondas testadas. C) Detalhe da hibridação diferencial do clone A2 (em réplica, retângulo) da biblioteca reversa hibridizada com sonda subtraída *Xac* e H_2O .

Esse resultado indicou portanto que provavelmente a subtração não foi eficaz. Para saber se estávamos tendo problemas com a sonda e não com os clones “espotados”, as membranas foram hibridizadas com sondas derivadas da transcrição reversa de mRNAs extraídos de folhas infiltradas com *Xac* ou H₂O (Figura 12 B). Apesar dessas sondas não serem adequadas ao “screening” diferencial devido à baixa abundância relativa dos transcritos, elas poderiam ainda detectar genes abundantemente expressos que apresentassem uma diferença superior a 10 vezes no seu nível de expressão (Sambrook e Russel, 2001). Diferenças significativas nas intensidades das hibridações entre os clones das duas bibliotecas não foram observadas, porém, alguns deles mostraram aparente expressão diferencial (Figura 12 B). Decidiu-se testar portanto, aqueles clones que visualmente apresentaram padrão de hibridação diferencial com as sondas subtraídas (Figura 12 A e C).

Uma vez que os resultados das hibridações indicaram que a subtração não havia funcionado, procurou-se obter sondas enriquecidas em transcritos diferenciais que pudessem detectar genes diferencialmente expressos. Para tanto, sondas foram amplificadas a partir da 1^a fita de cDNA da transcrição reversa dos tratamentos *Xac* ou H₂O com “primers” de sequência aleatória (10 pb – OPERON). Exemplos dos produtos de PCR gerados nessas reações estão apresentados na Figura 13. Como esperado, verificou-se que a maioria das bandas visíveis em gel foi semelhante entre as amostras *Xac* e H₂O, porém é possível verificar pequenas diferenças no perfil de bandas, sugerindo que os “primers” estariam amplificando seqüências distintas entre as duas populações de mRNA (Figura 13B).

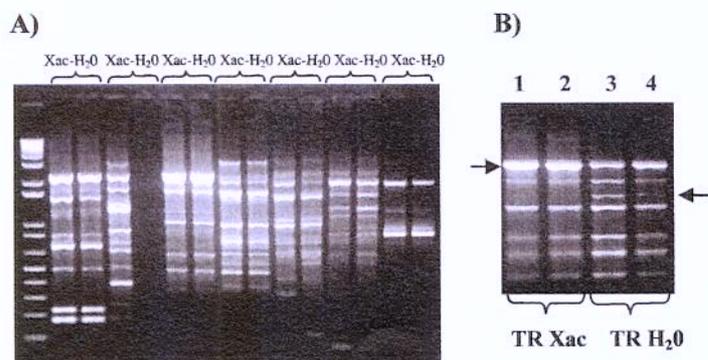
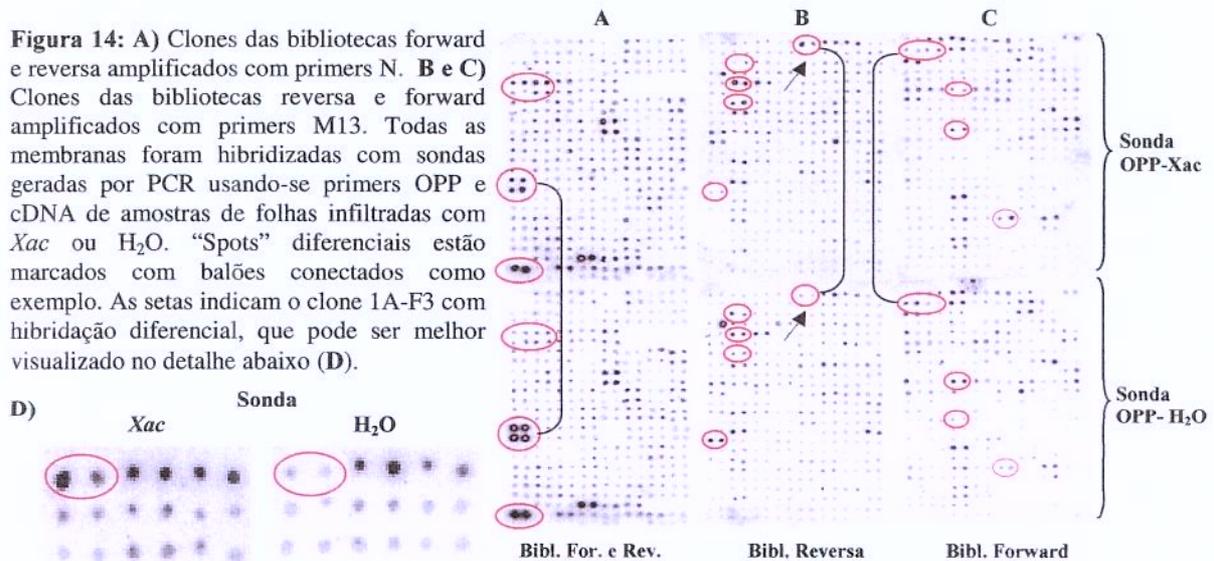


Figura 13. Gel agarose 1,5% de cDNAs amplificados da 1^a fita de cDNA provenientes dos mRNAs de folhas infiltradas com *Xac* ou água usando-se diferentes pares de óligos decâmeros (primers OPP). **A)** Amplificação da reação de transcrição reversa de *Xac* e H₂O com diferentes pares de primers OPP. **B)** Exemplo de PCR em duplicata da TR de *Xac* (1 e 2) e H₂O (3 e 4). As setas mostram bandas diferencialmente expressas entre as duas amostras.

Assim, escolheu-se um conjunto de produtos de PCR gerados com “primers” OPP que mostraram perfil diferencial de bandas para a geração e marcação das sondas utilizadas na hibridação de membranas contendo clones amplificados com primers N1 e 2 e M13F/R.

As hibridações com sondas OPP, em comparação com sondas derivadas da transcrição reversa de mRNAs extraídos de folhas infiltradas com *Xac* ou H₂O, demonstraram ser mais eficientes para a revelação de genes diferenciais nas membranas de dot blot. Portanto, deu-se a continuidade dos experimentos utilizando-se sondas OPP para a hibridação das membranas restantes. A partir dos resultados de dot blot foi feita a análise das membranas para a escolha dos “spots” que apresentaram diferenças significativas de intensidades (Figura 14).



O screening de dot blot resultou em 20 fragmentos de cDNA que apresentaram diferenciais de expressão nos tratamentos *Xac* e H₂O. Os plasmídeos de duas colônias independentes foram seqüenciados para a identificação dos insertos (Tabela 4). Após digestão com *PstI* e *SacII* (Figura 15) os insertos correspondentes foram purificados, marcados com αP^{32} e utilizados como sonda nos experimentos de Northern blot. Exemplos desses Northern blots estão apresentados na Figura 16. Três dos cDNAs isolados foram identificados como proteína Rubisco e, portanto, apenas um foi utilizado como sonda (2AA9). No total dos 20 genes isolados, apenas 17 foram testados por Northern blot e qPCR sendo que em vários dos Northern blots não foram verificadas diferenças entre os tratamentos *Xac* e H₂O devido à não detecção de bandas ou baixo sinal.

Tabela 4: Apresentação dos clones diferenciais isolados a partir das análises de dot blot. A identificação dos clones foi realizada através da busca por homologias nos bancos de dados NR e de EST usando o programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Clone	Homologia
1A-B5	EST: <i>Citrus sinensis</i> - gil61688812 gb DN619712.1 - 1e-103 gil66394520 gb AAAY46126.1 Domínio da proteína NAC - NAC6 [<i>Glycine max</i>] - 1e-85
1A-C3	EST: <i>Citrus sinensis</i> - gil61690190 gb DN621090.1 - 0.0 gil82400134 gb ABB72806.1 Álcool desidrogenase class III [<i>Solanum tuberosum</i>] - 4e-78
1A-D3	EST: Não há EST de citrus. gil30683133 ref NP_196599.2 - Helicase dependente de ATP/ helicase/ [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
1A-F2	EST: <i>Citrus sinensis</i> - gil61688013 gb DN618913.1 - 0.0 gil437997 emb CAA81079.1 glicina hidroximetiltransferase – (SHMT) [<i>Flaveria pringlei</i>]- 1e-84
1A-F3	EST: gil21650392 gb BQ623223.1 - <i>Citrus sinensis</i> - 2e-104 gil83284015 gb ABC01915.1 proteína receptora vacuolar - PV72 [<i>Solanum tuberosum</i>] – 2e-105
1A-H3	EST: <i>Citrus sinensis</i> - gil57933176 gb CX673659.1 - 0.0 gil18423002 ref NP_568707.1 - proteína desconhecida - [<i>Arabidopsis thaliana</i>]- 3e-39
1A-H4	EST: gil46209003 gb CN184066.1 - <i>Citrus sinensis</i> – 3e-129 gil728716 emb CAA59409.1 proteína do fotossistema II [<i>Spinacia oleracea</i>] – 9e-35
1G-E6	EST: <i>Citrus Sinensis</i> - gil57932051 gb CX672664.1 - 0.0 gil42795443 gb AAS46231.1 metionina sulfóxido redutase A [<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i> x <i>Populus deltoides</i>]- 3e-90
2D-B12	EST: <i>Citrus sinensis</i> - gil46206707 gb CN181770.1 - 5e-156 gil15235981 ref NP_193450.1 - RAB2 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]- 3e-117
2E-D10	EST: Não há EST de Citrus - <i>Prunus pérsica</i> - gil89494013 gb DY649807.1 - 8e-44 gil15222380 ref NP_172218.1 - ceramidase [<i>Arabidopsis thaliana</i>] - 3e-90
2E-D12	EST: <i>Citrus sinensis</i> - gil28856862 gb CB322204.1 - 3e-85 gil1545805 dbj BAAL0929.1 citocromo P450 [<i>Nicotiana tabacum</i>]- 8e-38
2I-B9	EST: gil62427629 gb DN795761.1 - <i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus temple</i> - 0.0 gil30793907 gb AAP40406.1 - proteína quinase com repetições ricas em leucina [<i>Arabidopsis thaliana</i>]- 2e-120
2I-F9	EST: Não há EST de Citrus - gil71885538 gb DT034593.1 - <i>Vitis vinifera</i> - 1e-150 gil91984056 ref YP_567140.1 proteína hipotética de cloroplasto - RF2 [<i>Vitis vinifera</i>]- 6e-72
2I-F12	EST: gil46210463 gb CN185526.1 - <i>Citrus sinensis</i> - 0.0 gil33637487 gb AAQ23899.1 - RSH2 [<i>Nicotiana tabacum</i>]- 3e-86
2I-G12	EST: <i>Citrus clementina</i> - gil63056907 gb CX288053.1 - 0.0 gil77556660 gb ABA99456.1 Fator de elongação [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] - 4e-61
2H-B9	EST: gil56587455 gb CX073465.1 <i>Citrus sinensis</i> – 0.0 gil10281004 dbj BAB13742.1 - regulador 7 de pseudo resposta [<i>Arabidopsis thaliana</i>]- 3e-39
2E-B6	EST: gil46216622 gb CN191683.1 - <i>Citrus sinensis</i> - 2e-142 gil12620881 gb AAG61120.1 ribulose-1,5-bifosfato carboxilase [<i>Gossypium hirsutum</i>]- 1e-69
1A-A8	EST: Não há EST de Citrus - gil71885538 gb DT034593.1 - <i>Vitis vinifera</i> - 6e-115 gil91984056 ref YP_567140.1 proteína hipotética de cloroplasto -RF2 [<i>Vitis vinifera</i>]- 6e-72
2H-D11	EST: gil46216622 gb CN191683.1 - <i>Citrus sinensis</i> - 2e-142 gil12620881 gb AAG61120.1 ribulose-1,5-bifosfato carboxilase [<i>Gossypium hirsutum</i>]- 1e-69
2A A9	EST: gil73491002 gb DT214569.1 - <i>Citrus sinensis</i> - 0.0 gil24940140 emb CAD1199.1 subunidade menor da Rubisco [<i>Coffea arabica</i>] – 1e-81

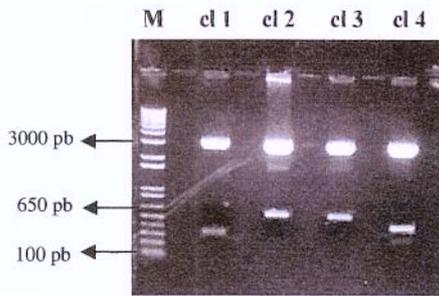


Figura 15: Exemplo de gel de agarose 0,8% mostrando a digestão de 4 dos clones isolados por dot blot. Liberação dos fragmentos clonados (~ 100-650 pb) após digestão com as enzimas *PstI* e *SacII*. As bandas de maior tamanho correspondem ao vetor pGEM (~ 3000 pb).

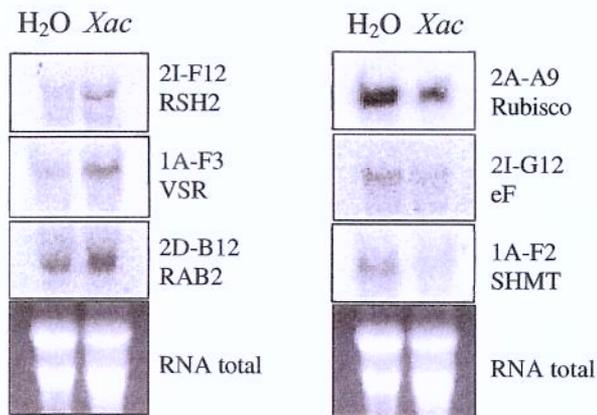


Figura 16. Exemplos de Northern blot de RNA total de folhas de citros infiltradas com H₂O e *Xac* após 10 dias de infiltração mostrando o padrão de expressão de 6 genes diferencialmente expressos incluindo Rubisco, RSH2, “vacuolar sorting receptor” (VSR), RAB2, provável fator de elongação (eF) e serina-hidroximetil transferase (SHMT).

4.6 - Análise da expressão dos genes identificados por dot blot através de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

Uma vez que cerca de 65% dos genes identificados não apresentaram diferencial nos experimentos de Northern blot, decidiu-se utilizar a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para quantificar as diferenças de expressão gênica entre as amostras infiltradas *Xac* e H₂O.

Inicialmente, analisou-se a expressão diferencial dos genes a partir de amostras de RNA total de folhas infiltradas com *Xac* ou H₂O após dez dias de infecção. Entretanto, com o intuito de complementar os dados iniciais obtidos neste projeto, foram estudadas também as diferenças na expressão dos genes identificados em resposta à infecção por *Xaa*, que causa cancro apenas no limão galego (Brunings e Gabriel, 2003). A análise da expressão diferencial desses genes em respostas às bactérias *Xac* e *Xaa* poderia revelar quais dos genes identificados estariam relacionados ao desenvolvimento do cancro cítrico, ou à reação de HR em folhas de laranja.

Para validação e quantificação dos resultados obtidos, foram feitos qPCRs em triplicata utilizando cDNAs provenientes de diferentes plantas infiltradas com *Xac*, *Xaa* e H₂O, após 48 horas e 10 dias da infecção. Os valores de expressão gênica foram calibrados com a referência H₂O e normalizados com o EST CK937155 de laranja doce o qual não apresentou variações na expressão entre os tratamentos *Xac*, *Xaa* e H₂O (Figura 17).

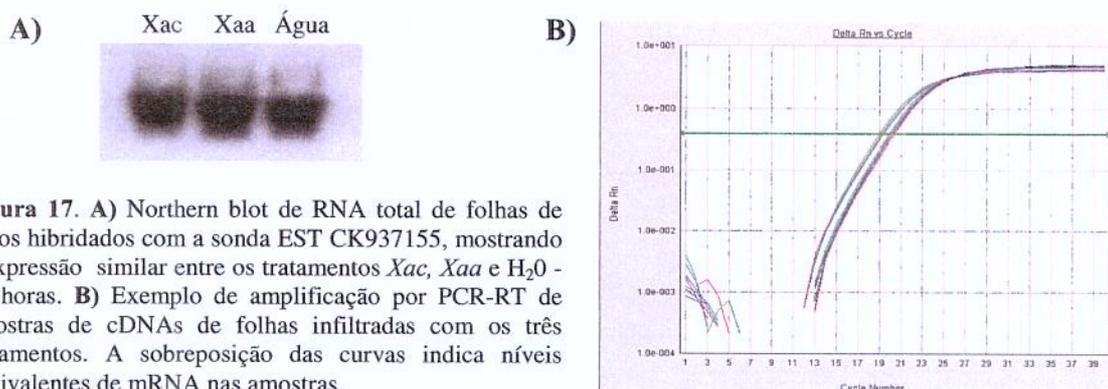


Figura 17. A) Northern blot de RNA total de folhas de citros hibridados com a sonda EST CK937155, mostrando a expressão similar entre os tratamentos *Xac*, *Xaa* e H₂O - 48 horas. B) Exemplo de amplificação por PCR-RT de amostras de cDNAs de folhas infiltradas com os três tratamentos. A sobreposição das curvas indica níveis equivalentes de mRNA nas amostras.

As curvas de dissociação dos fragmentos amplificados foram analisadas e somente as amostras que apresentaram um único produto de amplificação foram consideradas na análise dos resultados (Figura 18). Assim, do total de 17 clones testados por qPCR, os dados dos genes 1A-C3 (álcool desidrogenase) e 1A-H4 (Proteína fotossistema II) não foram considerados pois estas amostras apresentaram mais de um produto de amplificação na curva de dissociação. Além disso, clone o 2A-A9 (proteína Rubisco) não foi analisado por qPCR uma vez que os dados de Northern eram claros e bastante concordante com os dados da literatura que mostram regulação negativa da Rubisco em resposta à ataque de patógenos (Reinbothe *et al.*, 1994; Desimone *et al.*, 1996).

A Tabela 5 reúne portanto os resultados de qPCR das amostras de folhas infiltradas com H₂O, *Xac* e *Xaa* após 48 horas e 10 dias da infiltração. Embora tenha havido uma correspondência entre os resultados de Northern blot e qPCR, a técnica de qPCR é mais sensível na detecção devido a facilidade na sua quantificação, maior sensibilidade, reprodutibilidade, acurácia e velocidade de análise sendo necessárias para isso, poucas quantidades de material em comparação com o Northern. Portanto, a técnica de qPCR foi importante para a validação dos genes diferencialmente expressos.

Tabela 5. Resumo dos resultados de qPCR dos genes expressos diferencialmente em folhas de laranja doce infiltradas com *Xac*, *Xaa* e H₂O após 48 horas e 10 dias de infecção. Os valores de expressão gênica foram calibrados com a amostra H₂O (1,0).

Clone	Identificação do gene	Indução					
		Infiltração 48 horas			Infiltração 10 dias		
	Transdução de sinal de auxina	H ₂ O	Xaa	Xac	H ₂ O	Xaa	Xac
1A-B5	Fator de transcrição NAC	1.0	1.8	4.5	1.0	8.4	3.2
	Tráfego e fusão de vesículas						
2D-B12	RAB2	1.0	2.0	2.0	1.0	4.6	1.8
1A-F3	Receptor vacuolar	1.0	2.5	2.3	1.0	4.0	2.7
	Resistência e resposta de defesa						
2I-B9	Proteína quinase LRR	1.0	0.9	0.9	1.0	7.0	6.2
2I-F12	RSH2	1.0	6.0	4.5	1.0	0.6	1.0
	Ciclo celular/síntese de proteínas						
2I-G12	Fator de alongação	1.0	0.5	0.5	1.0	3.2	1.2
2I-F9	Proteína de cloroplasto RF2 / ycf2	1.0	0.8	0.8	1.0	3.4	0.7
1A-D3	Helicase	1.0	1.6	1.0	1.0	5.3	3.5
	Metabolismo C - N						
1A-F2	Serina hidroximetiltransferase	1.0	0.4	0.4	1.0	1.0	0.8
2H-B9	Regulador de pseudo resposta	1.0	1.5	1.3	1.0	2.0	2.0
1G-E6	Metionina sulfóxido redutase A	1.0	0.9	0.9	1.0	5.0	1.5
2E-D10	Ceramidase neutra/alcalina	1.0	0.9	0.8	1.0	5.0	1.4
	Metabolismo secundário						
2E-D12	Citocromo P450	1.0	4.1	2.9	1.0	5.0	2.1
	Proteínas hipotéticas/desconhecidas						
1A-H3	Proteína desconhecida	1.0	2.5	2.6	1.0	1.0	1.0

4.7 - Identificação e provável função dos genes diferencialmente expressos

4.7.1 - Genes envolvidos na percepção e transdução de sinal de auxinas/giberilinas

O clone 1A-B5 é homólogo a membros da família de fatores de transcrição NAC. Esses fatores de transcrição controlam desenvolvimento floral (Sablowski e Meyerowitz, 1998), transdução de sinal de auxina e giberilina (Xie *et al.*, 2000; Robertson, 2004), resposta a estresse hídrico (Tran *et al.*, 2004; Ohnishi *et al.*, 2005) e senescência em folhas (Guo e Gan, 2006). 1A-B5 é homólogo a uma proteína tipo NAC (NAP) de *Arabidopsis*, isolada como alvo imediato de APETALA3/PISTILATA que controla a transição entre divisão e expansão celular em pétalas e estames (Sablowski e Meyerowitz, 1998). 1A-B5 também se assemelha a uma proteína NAC de cevada que interage com o fator SPY, um regulador negativo da resposta a

giberilinas (Robertson, 2004). Entretanto, SPY regula outras respostas não relacionadas à ação de giberilinas como a ativação do promotor do gene “dehydrin” induzido por ácido abscísico (Robertson, 2003).

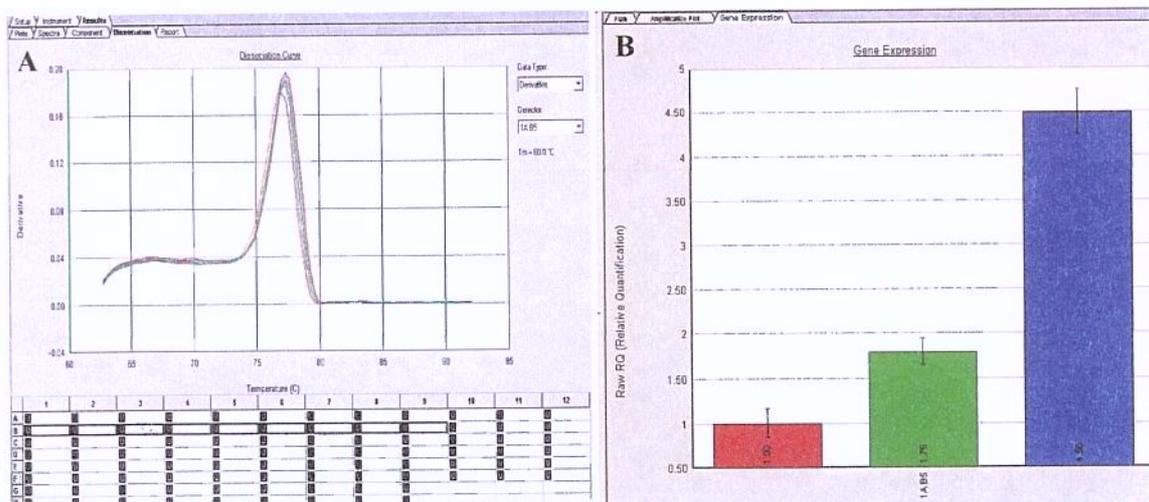


Figura 18. Exemplo de resultados obtidos pelo software 7500 System SDS na amplificação do gene diferencial 1A-B5 (provável proteína NAC1). **A)** Curvas de dissociação dos PCRs em tempo real obtidos pela amplificação do clone diferencial 1A-B5 a partir de amostras água, *Xaa*, *Xac*. **B)** Resultado da expressão diferencial do gene 1A-B5 nos tratamentos H₂O (vermelho), *Xaa* (verde) e *Xac* (azul).

1A-B5 também é semelhante a NAC1 de *Arabidopsis*, uma proteína que media a transdução de sinal da auxina durante o desenvolvimento de raiz lateral. Plantas de *Arabidopsis* NAC “antisense” apresentam menos raízes secundárias e a expressão de NAC1 no mutante *tir1* (transport inhibitor resistance) restaura a formação dessas raízes (Xie *et al.*, 2000), indicando que NAC1 age “downstream” a TIR1 e apresenta uma função no processo de iniciação do desenvolvimento de raízes laterais. TIR1 é um receptor de auxina da família F-box (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski *et al.*, 2005), uma proteína do complexo proteassoma que controla a proteólise de reguladores da resposta à auxina. É interessante notar que uma proteína tipo F-box semelhante a TIR1 foi isolada por “Differential Display” em nosso laboratório a partir de folhas de laranja infiltradas com *Xac* e *Xaa* (Celso E. Benedetti e Raul Andrés Cernadas, dados não publicados), sugerindo que essas bactérias alteram vias de sinalização de auxinas. Consistente com esses dados, nosso laboratório também encontrou que *Xac* e *Xaa* (em menor grau) alteram a expressão de genes envolvidos no transporte polar de auxinas (Raul Andrés Cernadas, dados não publicados). Portanto, sugere-se que o clone 1A-B5

esteja associado à transdução de sinal de auxina durante o fenômeno de divisão e expansão celular que ocorre em resposta a infecção por *Xac*.

4.7.2 - Genes envolvidos no tráfico, atracamento e fusão de vesículas

Resumidamente, o transporte mediado por vesículas envolve três etapas principais: a primeira é executada por complexos protéicos que recobrem as vesículas e incluem as proteínas clathrina e COP (coatomer), envolvidas no brotamento e seleção do “carga”; a segunda envolve o movimento e direcionamento das vesículas para o compartimento aceptor, sendo que proteínas da família Rab-GTPases tem papel importante nesse processo; a terceira etapa envolve o atracamento e fusão das vesículas mediadas por receptores SNAP denominados SNAREs (Xu *et al.*, 2002). Além disso, as plantas apresentam diferentes vacúolos funcionais em uma mesma célula e apresentam dois compartimentos vacuolares separados: os líticos e os de reserva. Estes contém marcadores TIP em suas membranas os quais são úteis para distinguir vacúolos com funções distintas (Jauh *et al.*, 1999; Paris *et al.*, 1996; Okita, 1996). Vacúolos de proteínas de reserva (PSV – “Protein Storage Vacuoles”) caracterizam-se pela presença de α -TIP em suas membranas (Jonhson *et al.*, 1989; Paris *et al.*, 1996). Tais proteínas de reserva, após subsequente degradação, são utilizadas como fonte de carbono e nitrogênio para a célula. O vacúolo lítico possui pH ácido, contém enzimas proteolíticas, e é caracterizado pela presença da proteína marcadora TIP-Ma-27 (Okita, 1996; Paris *et al.*, 1996).

Devido à manutenção de diferentes vias de separação, as plantas dependem de receptores que devem distinguir proteínas destinadas à vacúolos líticos daquelas destinadas à vacúolos de armazenamento (Paris *et al.*, 1997). Jauh *et al.* (1999) sugere que células de plantas apresentam habilidade para gerar e manter três organelas vacuolares separadas, sendo que cada uma seria marcada por uma TIP diferente. Desse modo, a diversidade funcional de sistemas vacuolares poderia ser gerada por diferentes combinações dos três tipos básicos de TIPs.

O clone 1A-F3, que apresentou aumento de expressão em resposta à infecção por *Xac* e *Xaa*, codifica um provável “vacuolar sorting receptor” (VSR) semelhante aos receptores vacuolares AtVSR1 de *A. thaliana* e BP-80 de cevada. BP-80 foi purificada a partir vesículas

recobertas com clathrina (envolvida no transporte de proteínas do Golgi para vacúolos) que se liga a proteínas alvos em pH neutro no Golgi e as libera no vacúolo sob pH ácido (Kirsch *et al.*, 1994; Paris *et al.*, 1997, Cao *et al.*, 2000).

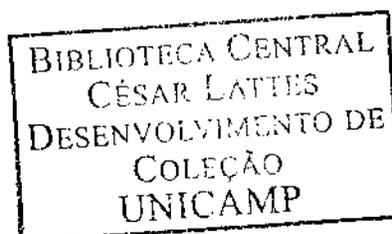
O clone 2D-B12 é homólogo a uma Rab2-GTPase de tabaco que regula o tráfico de vesículas entre RE (retículo endoplasmático) e corpúsculos de Golgi durante o crescimento do tubo polínico (Cheung *et al.*, 2002). O alongamento do tubo polínico depende da deposição de membrana e material de parede celular para sustentar o rápido crescimento da ponta do tubo (Hepler *et al.*, 2001).

As Rab2, presentes na segunda etapa de transporte de vesículas, são GTPases monoméricas pequenas que regulam uma variedade de processos na célula, incluindo crescimento, diferenciação celular e principalmente transporte de vesículas (Tisdale, 2001). Análises genéticas e bioquímicas mostram que essas GTPases são essenciais para o transporte de vesículas para alvos específicos em compartimentos endomembranas ou para a membrana plasmática (Batoko *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2001).

O tráfico de vesículas, entretanto, também é importante nos tecidos em crescimento e alongação pois nesses setores há a necessidade de se secretar grandes quantidades de membrana e material da parede celular, além das proteínas que modulam essas estruturas. A expressão aumentada dos clones 1A-F3 e 2D-B12 é portanto consistente com análises adicionais feitas em nosso laboratório que mostram que *Xac* e *Xaa* (em menor grau) induzem a expressão de várias outras proteínas envolvidas em tráfico, atracamento e fusão de vesículas, como Epsina, COP e t-SNARES e de várias proteínas envolvidas em remodelamento da parede celular, como celulases, expansinas, glucanases e pectinoesterases (Raul Andrés Cernadas e Celso E. Benedetti, dados não publicados). Portanto, o aumento da atividade dos genes relatados acima indica fortemente uma associação com o crescimento e expansão celular causados por *Xac*.

4.7.3 - Genes envolvidos em resistência e defesa

O clone 2I-B9 codifica um provável receptor de defesa tipo LRR-RLK (“leucine-rich repeat class of receptor-like kinase”), envolvido em diversas funções biológicas como defesa contra patógenos, processos de regulação do desenvolvimento e percepção ou transdução de sinais



hormonais (Jones e Jones, 1996). Embora o clone 2I-B9 tenha apresentado indução nos tratamentos *Xac* e *Xaa* após dez dias da infecção, esse gene não apresentou alteração de expressão quando as amostras foram analisadas por Northern blot (dados não mostrados). Uma vez que a curva de dissociação do clone 2I-B9 apresentou dois picos distintos, é possível que a expressão diferencial detectada nas amostras *Xac* *Xaa* seja devido ao outro amplicon. Isso explicaria a discrepância entre o resultado de Northern e qPCR para o clone 2I-B9.

O clone 2I-F12 é semelhante à proteína RSH1 de *Arabidopsis* que interage com o gene de resistência RPP5 (van der Biezen *et al.*, 2000). RSH1 é homóloga à uma RelA/SpoT de *Arabidopsis*, que determina os níveis de guanosina tetrafosfato (ppGpp) e guanosina pentafofato (pppGpp), os quais são nucleotídeos efetores da resposta estringente de bactérias às restrições nutricionais de carbono, nitrogênio e fosfato (Cashel *et al.*, 1995; van den Biezen *et al.*, 2000). RelA transfere grupos pirofosfatos do ATP para GDP e GTP, resultando no acúmulo de ppGpp, que se liga a RNA polimerase e reprograma a transcrição geral em bactérias, inibindo a síntese de componentes de síntese protéica para poupar energia em condições de estresse. O fato que RSH1 de *Arabidopsis* complementa a função RelA em *E. coli* (van der Biezen *et al.*, 2000) e RSH2 de tabaco apresenta atividade de síntese de ppGpp em bactéria (Givens *et al.*, 2004) sugere que as RSHs sintetizam ppGpp em plantas. O papel regulatório de (p)ppGpp em plantas entretanto não é conhecido, mas por analogia ao sistema em bactérias, é possível que (p)ppGpp seja um cofator de transcrição de respostas rápidas (estringentes) como as que ocorrem durante o ataque de patógenos, ferimento e outros tipos de estresse. Genes relacionados com a síntese protéica e fotossíntese possivelmente estariam envolvidos na desativação do sistema fotossintético na área infiltrada. 2I-G12 (fator de alongação da síntese protéica) e Rubisco (Figura 16) estão com a expressão reprimida tanto por *Xac* quanto por *Xaa* (48 horas) e, por serem proteínas envolvidas na síntese protéica e fotossíntese, é possível que o clone RSH2 de citros (2I-F12) esteja diretamente ligado à regulação negativa desses genes.

4.7.4 - Genes envolvidos no ciclo celular, síntese e degradação de proteínas

O clone 2I-G12 é homólogo ao fator de alongação eucariótico EF-1 α , elemento chave na tradução de proteínas eucarióticas (Negrutskii e El'skaya., 1998). Como discutido acima, 2I-G12 teve expressão reprimida por *Xac* e *Xaa* no início da infecção, o que sugere que essas

bactérias induzem uma resposta de estresse na planta que acarreta a queda da síntese protéica e fotossíntese. Esse fenômeno é bastante conhecido nas interações planta-patógeno e é regulado por sinalizadores tipo jasmonatos, moléculas sinalizadoras de resposta de defesa a ataque de insetos, patógenos e injúria mecânica (Devoto e Turner, 2003). Os jasmonatos controlam ainda vários aspectos do desenvolvimento da planta como deiscência de antera e crescimento de raiz (Feys *et al.*, 1994; Ishiguro *et al.*, 2001), induz a expressão de proteínas de defesa (Devoto *et al.*, 2005) e da clorofilase (Benedetti e Arruda, 2002) e reprime a síntese de proteínas relacionadas à fotossíntese como Rubisco e proteínas do fotossistema II (PSII) (Reinbothe *et al.*, 1994), que também foram isoladas em nossa análise diferencial por “dot blot”, mas não foram testadas por qPCR (Tabela 4). A produção de JA em resposta à *Xaa* e *Xac* seria consistente com a diminuição na expressão da Rubisco e do 2I-G12. Em reforço a essa idéia, genes que codificam enzimas da via de síntese de jasmonatos, como fosfolipases e lipoxigenases, foram isolados em resposta à infecção por estas bactérias em “screening” adicional feito em nosso laboratório (Raul Andrés Cernadas e Celso E. Benedetti, dados não publicados). Além disso, um cDNA homólogo ao gene VARI de *Arabidopsis* que codifica uma proteína de tilacóide envolvida no “turnover” de PSII foi isolado em resposta à *Xaa* (Raul Andrés Cernadas e Celso E. Benedetti, dados não publicados). Assim, esses dados em conjunto sugerem que *Xac* e *Xaa* (em menor grau) inibem síntese protéica e fotossíntese e que a ativação da fosfolípase e lipoxigenases sugere a síntese aumentada de JA no tecido infiltrado e conseqüente indução da clorofilase gerando clorose, fenômeno observado nas lesões causadas por *Xac* e *Xaa*.

O clone 1A-D3 é homólogo a um domínio de proteínas helicases que catalisam o desenrolamento da dupla fita de DNA ou RNA e portanto apresentam função essencial em processos celulares como replicação, reparação, recombinação e transcrição de DNA/RNA (Tuteja e Tuteja, 2004). 1A-D3 é semelhante à proteína helicase PDH45 de *Pisum sativum* e que apresenta 93% de identidade com o fator de alongação eIF4A de tabaco (Pham *et al.*, 2000). A proteína PDH45 foi localizada no núcleo e citoplasma das células e além de apresentar atividade de catálise do desenrolamento da dupla fita de DNA nas direções 5´ e 3´ interagiu com a proteína topoisomerase I, estimulando sua atividade na célula. Esses dados sugerem que a proteína helicase de *Pisum sativum* tenha múltiplas funções na síntese de proteínas, manutenção das atividades básicas da célula e na regulação da atividade da

topoisomerase I (Pham *et al.*, 2000). As helicases também podem apresentar funções na regulação do crescimento da planta e no desenvolvimento da mesma sob condições de estresse através da regulação de algumas vias induzidas por estresse.

De acordo com nossos resultados, o gene 1A-D3 apresentou um aumento de expressão nos tratamentos *Xac* e *Xaa* principalmente aos 10 dias após a infecção, o que correlaciona com a alta atividade de divisão celular do tecido infectado.

O clone 2I-F9 apresentou similaridades com proteínas hipotéticas de cloroplasto sem função relacionada aos fenômenos de hiperplasia e hipertrofia celular.

4.7.5 - Genes envolvidos no metabolismo, transporte de carbono e nitrogênio e fotorrespiração

O clone 1A-F2 é semelhante à serina hidroximetiltransferase (SHMT), enzima relacionada a fotorrespiração e à resistência a estresses bióticos e abióticos (Moreno *et al.*, 2005). A inibição da expressão de uma SHMT de citros (clone 1A-F2) em resposta à infecção por *Xac* e *Xaa* é consistente com a diminuição da fotossíntese nas folhas infectadas. É interessante notar que plantas de batata antisense para o gene SHMT apresentam menor capacidade fotossintética (Schjoerring *et al.*, 2006).

O clone 2H-B9, pouco induzido nos tratamentos *Xac* e *Xaa*, é homólogo ao regulador 7 de pseudo resposta (PRR - Pseudo-Response Regulator) de *Arabidopsis thaliana*. Esses reguladores apresentam funções relacionadas com ritmos circadianos (Nakamichi *et al.*, 2005; Salome e McClung, 2005). Não há relatos da função desses genes associada ao ataque de patógenos ou desenvolvimento de hipertrofia e hiperplasia.

1G-E6 apresentou homologia com uma metionina sulfoxide redutase (MSR), uma enzima antioxidante que catalisa a redução de resíduos de metionina sulfóxido para metionina. Análises do banco de dados de EST de *Arabidopsis* indicam que MSR é expressa em altos níveis na planta (Sadanandom *et al.*, 2000). Estudos de longa exposição de folhas de *Arabidopsis* ao vírus do mosaico da couve-flor demonstraram aumento expressivo na indução da MSR após infecção, sugerindo novas funções para MSRs em tecidos fotossintéticos e na resposta de defesa contra patógenos em plantas (Sadanandom *et al.*, 2000). As plantas podem responder ao ataque de patógenos através da HR e esta envolve a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este mecanismo pode ser comparado à resposta de neutrófilos à

infecção microbiana, quando MSRs podem reparar proteínas danificadas por ROS (Moskovitz *et al.*, 1996). Os níveis de proteínas MSR plastidiais também diminuem de forma significativa nos eventos anteriores à senescência de folhas. Nesse período, ocorre elevada proteólise de enzimas como a Rubisco, seguida do aumento dos níveis de ROS e conseqüentemente levando à sintomas visíveis de senescência nas folhas. (He *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 1997; Desimone *et al.*, 1998). Verificamos que a expressão de 1G-E6 está aumentada preferencialmente no tratamento com *Xaa* com 10 dias de infecção. Uma vez que *Xaa* causa HR em laranja, provavelmente a indução desse gene estaria relacionado à reparação de proteínas que podem ter sofrido danos conseqüentes da produção de ROS na HR.

O clone 2E-D10 apresentou semelhanças com uma ceramidase de *Arabidopsis*. As ceramidases hidrolizam a ligação N-Acil entre o ácido graxo e uma base da esfingosina de ceramidas, que são formadas pela combinação de um ácido graxo livre ou acetil CoA e esfingosina.

As ceramidas são o principal mensageiro intracelular que media a resposta celular à apoptose, controle do ciclo celular e diferenciação através dos seus metabólitos esfingosinas e esfingosina1-fosfato (Cuvillier, 2002; Choi *et al.*, 2003). Portanto, a regulação da expressão e da atividade do gene da ceramidase é demasiado importante no controle de respostas biológicas específicas (Choi *et al.*, 2003). Há evidências de que esfingolípídeos de plantas podem estar envolvidos na transdução de sinal, estabilidade de membrana, interações planta-patógeno e resposta a estresse (Sperling e Heinz, 2003). Até o momento, entretanto, não foram descritas ceramidases de plantas, apenas verifica-se homologia de seqüências nos bancos de dados.

O clone 2E-D10 mostrou aumento de expressão nos tratamentos *Xac* e *Xaa* após 10 dias de infecção, mas a expressão foi similar ao do controle H₂O num período de 48 horas.

4.7.6 - Genes envolvidos na síntese de metabólitos secundários

O clone 2E-D12, induzido nos tratamentos *Xac* e *Xaa*, apresentou homologia com um citocromo P450 monooxigenase de tabaco que apresenta atividades relacionadas ao metabolismo de xenobióticos (Sugiura *et al.*, 1996). Citocromos P450 são enzimas que

apresentam funções relacionadas à síntese e degradação de metabólitos secundários de terpenóides em plantas (Ro *et al.*, 2005).

É interessante notar que em análises adicionais de expressão gênica diferencial feitas em nosso laboratório, vários genes da via de síntese de terpenóides e giberelinas foram isolados com expressão aumentada nos tecidos infiltrados com *Xac*. Assim, o clone 2E-D12 pode ter papel na via de síntese de giberelinas e estar associado à formação da lesão do cancro ou hipertrofia celular.

4.7.7 - Proteínas Hipotéticas/desconhecidas

O clone 1A-H3 é homólogo à uma proteína desconhecida de *Arabidopsis*. O clone 1A-H3 foi pouco induzido em folhas com 48 h de infecção, porém não foram observadas alterações na expressão deste gene nos tratamentos *Xac* e *Xaa* após 10 dias de infecção.

Diferente do esperado, observamos padrão de expressão gênica semelhante entre os tratamentos *Xac* e *Xaa*. Isso ocorreu também com um conjunto mais extenso de genes (cerca de 100) identificados em uma análise mais global, exceto que para a maioria desses genes o aumento na expressão foi superior no tratamento com *Xac* (Raul Andrés Cernadas e Celso E. Benedetti, dados não publicados). Esses resultados nos intrigou e nos fez reavaliar o modelo de patogenicidade de *Xaa*, uma vez que estávamos trabalhando com a premissa de que *Xaa* causa HR em laranja, e portanto, não esperávamos encontrar expressão de genes relacionados ao desenvolvimento do cancro. Uma forma de entender esses dados foi analisar o crescimento das duas bactérias em folha de laranja (Figura 19). Observa-se que *Xaa* é capaz de se manter viável no mesófilo sem entretanto crescer exponencialmente como *Xac*. Esse padrão de crescimento é característico dos chamados “non-pathogens” e não representa um padrão típico de HR, que deveria mostrar um rápido declínio no número de células ao longo dos três primeiros dias após a infiltração. Esses dados indicaram portanto que tal crescimento de *Xaa* nas folhas de laranja poderia explicar a indução de genes sem o aparecimento dos sintomas do cancro.

Em resumo, o presente estudo analisou, através da técnica de hibridação subtrativa suprimida (SSH), diferenças na expressão gênica de folhas de laranja (variedade Pêra) infiltradas com a bactéria *Xac* (cepa 306) em comparação com folhas infiltradas com água estéril. Foram identificados 20 genes diferencialmente expressos em resposta à infecção por

Xac em relação ao controle. A expressão diferencial desses genes foi validada por Northern blot e qPCR em amostras independentes de mRNA provenientes de folhas infiltradas com *Xac*, *Xaa* ou H₂O 48h e 10 dias após a infiltração. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho de análise da expressão de genes de laranja em resposta à *Xac* e *Xaa*.

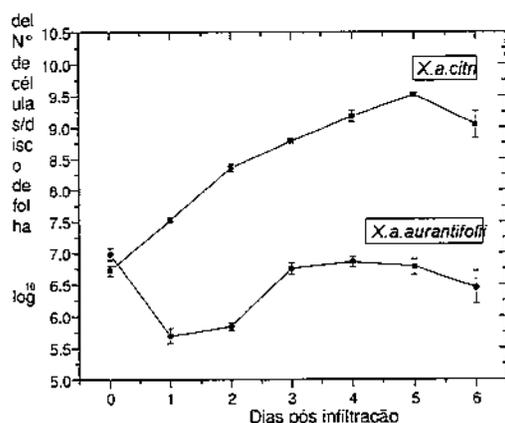


Figura 19. Curva de crescimento de *Xac* e *Xaa* em folhas de laranja Pêra durante seis dias após a infiltração. Folhas foram infiltradas com suspensões de *Xac* ou *Xaa* e as bactérias foram extraídas do tecido foliar nos tempos indicados pela maceração da folha em tampão PBS. As suspensões foram plaqueadas em diluições seriadas para estimativa do número de células por disco de folha (Cernadas, 2005 - dados não publicados).

Nossos resultados demonstraram que nas interações *Xac/Xaa* e *Citrus sinensis* foram verificadas a expressão diferencial de genes envolvidos em vias de transdução de sinal de auxina, tráfico e fusão de vesículas, resistência e resposta de defesa, síntese de proteínas e ciclo celular, metabolismo de carbono-nitrogênio e fotorrespiração e metabolismo secundário. Embora neste trabalho tenha sido analisado um pequeno número de genes, vários deles estão associados a vias, já relatadas na literatura relacionadas à resposta de defesa em plantas (Lipka e Panstruga, 2005; Dangl e Jones, 2001; Staskawick, 2001; Lindgreen, *et al.*, 1992).

O trabalho apresentado aqui é complementar à uma análise mais global de expressão gênica em citros em resposta à *Xac* e *Xaa*, utilizando-se as técnicas de SSH e “differential display”. Após a identificação do problema da baixa eficiência de ligação dos adaptadores do kit SSH da Clontech, foram feitas mudanças nos oligos adaptadores e melhores bibliotecas foram obtidas. Além disso, vários genes diferenciados foram isolados por “differential display” (Raúl Andrés Cernadas e Celso E. Benedetti, dados não publicados). Os resultados dessa análise mais global de cerca de 120 genes, incluindo os apresentados neste trabalho, mostram de forma clara que *Xac* e *Xaa* (em menor grau) ativam genes que controlam o remodelamento da parede celular, transporte e percepção de auxina, síntese de terpeno, giberelina e brassinosteróides, tráfico e

transporte de vesículas e respostas de defesa, entre outros processos. A atividade desses genes explica portanto parte dos sintomas do cancro como hiperplasia e hipertrofia das células.

A identificação e o estudo aprofundado dos genes diferencialmente expressos em *Citrus sinensis* infectadas com *Xac* pode contribuir na revelação dos alvos do gene *pthA* e poderia levar a um melhor entendimento das respostas de hipertrofia e hiperplasia. Tais genes poderiam ser silenciados em resposta à infecção por *Xac* através da expressão dos respectivos antisenses sob controle de promotores que respondam especificamente à infecção por *Xac*. Tais plantas poderiam apresentar redução na formação de lesões e portanto menor dispersão da bactéria.

4.8 - Clonagem, expressão e purificação do domínio C-terminal de PthA1 com cauda de histidina (cPthA1)

Como descrito na introdução deste trabalho, a região C-terminal da proteína PthA apresenta sinais de localização nuclear funcional (NLS) e um domínio ácido de ativação da transcrição (AAD). Devido à importância desse domínio para o funcionamento da proteína PthA, decidiu-se expressá-lo para a realização de ensaios de cristalização da proteína, uma vez que não há até o momento, nenhuma estrutura tridimensional conhecida para qualquer dos membros da família de proteínas AvrBs3/PthA.

Desse modo, a construção pET28a-cPthA 1 foi expressa em células de *E. coli*. Os resultados de indução demonstraram que o clone cPthA1 expressou a proteína de forma eficiente, porém após a lise das células, a maior parte da proteína permaneceu na fração insolúvel. Uma pequena fração da proteína solúvel pôde ser purificada por cromatografia de afinidade (Figura 20). Entretanto, após a concentração das frações contendo a proteína de interesse, não se obteve uma quantidade suficiente para os experimentos iniciais de cristalização. Além disso, foram observados alguns contaminantes (Figura 20), o que demonstra a necessidade de uma etapa adicional de purificação. Decidiu-se repetir a indução do clone cPthA 1 com maior volume de inóculo a fim de aumentar a concentração da proteína solúvel. Para analisarmos quais seriam as melhores condições para a indução do C-terminal da PthA, foram realizadas mini-induções de 10 mL, as quais foram crescidas em diferentes condições de temperatura e indução. Os inóculos foram então incubados sob agitação constante de 200 rpm sob temperaturas de 28° e 30° C e as induções foram feitas com lactose e

IPTG para a verificação do melhor indutor. Os resultados demonstraram que as induções deveriam ser feitas sob temperatura de 28° C e induzidas por IPTG (dados não mostrados).

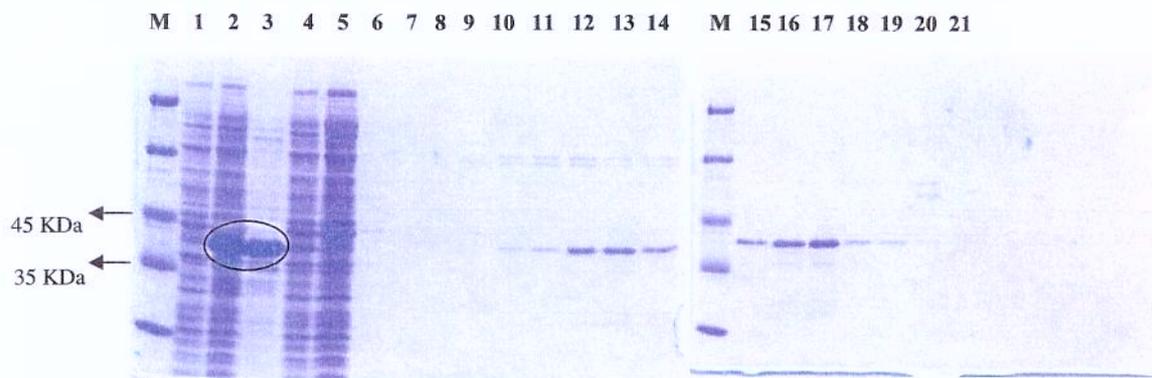


Figura 20. Exemplo da expressão e purificação do domínio C terminal da proteína PthA por cromatografia de afinidade. Gel SDS 10%. A) M: Protein Molecular weight (MBI Fermentas), 1: amostra não induzida; 2: indução por 2h; 3: “pellet” do lisado; 4: sobrenadante do lisado; 5: “flowtrought”; 7 : lavagem com 1 volume de coluna (vc); 8, 9 e 10: eluição com TS20; 11 e 12: eluição com TS30; 13, 14 e 15: eluição com TS50; 16, 17 e 18: eluição com TS80; 19, 20 e 21: eluição com TS100. As bandas circuladas correspondem ao cPthA1 induzido.

No presente trabalho não foi finalizada a obtenção do domínio carboxi-terminal da proteína PthA, entretanto, ensaios continuam sendo realizados para que futuramente seja obtida uma concentração suficiente da proteína para estudos de estrutura e para ensaios de transfecção com o peptídeo AID (Chang *et al.*, 2005).

4.9 – Clonagem de *pthAs* 1, 2 e 4 em vetor pBI121 para experimentos de agroinfecção em folhas de laranja.

Paralelamente ao desenvolvimento do projeto foram realizados também ensaios de agrotransfecção a fim de se obter a expressão transiente da proteína PthA em folhas de *Citrus sinensis* e dessa forma seria analisada a expressão dos genes diferenciais, obtidos nos tratamentos *Xac* e H₂O, que poderiam ser dependentes da proteína PthA. Além disso, foram feitas construções de PthA2 e 4 fusionados à proteína EGFP, para estudos de localização nuclear de PthA.

Os plasmídios dos clones *pthA*-pET29a, previamente obtidos em nosso laboratório (Celso E. Benedetti), foram digeridos com a enzima *Ssp*I para identificação dos *pthAs* (Figura 21A). Subseqüentemente, os *pthAs* 1, 2 e 4 e *pthAs* 2 e 4 fusionados a EGFP foram ligados no vetor pBI121 (Figura 21B) e inseridos nas cepas de *A. tumefaciens* C58, LBA4404, EHA105 e

GV3101. Os clones transformantes foram identificados por PCR (Figura 22) e confirmados por sequenciamento das extremidades.

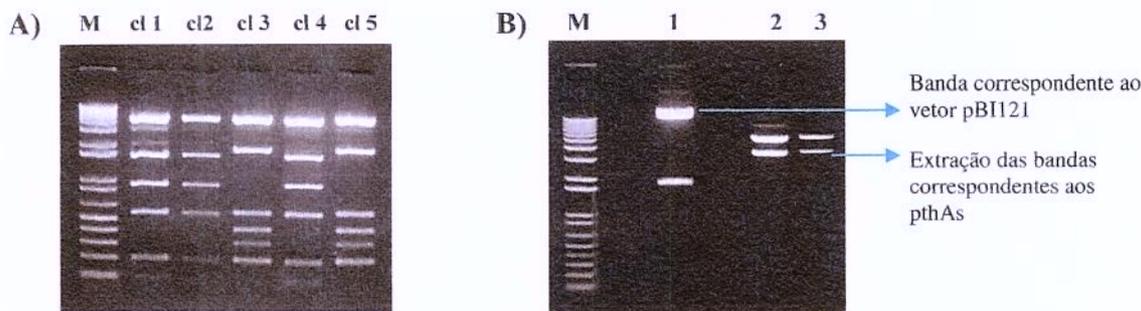


Figura 21. A) Gel de agarose 0.8%. Digestão dos clones transformados com diferentes *pthAs* com a enzima *SspI*. De acordo com o padrão de digestão, os clones 1, 2 e 4 correspondem ao gene *pthA* 2 e os clones 3 e 5, correspondem ao gene *pthA* 1. B) Exemplo de gel de agarose 0.8% com: 1- Digestão de um clone para a liberação do vetor pBI121; 2 e 3 – digestão dos clones que contém os *pthAs* 2 e 4 para a ligação no vetor

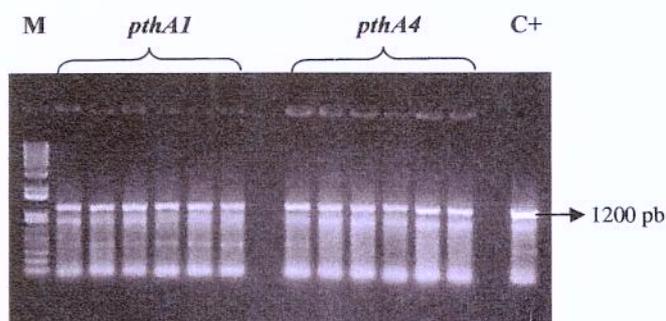


Figura 22. Gel agarose 1% mostrando exemplo de PCR de colônia. Amplificação dos genes *pthAs* 1 e 4 fusionados a GFP com os primers *pthAN2* e *EGFP-R*. O controle positivo pode ser visualizado na última canaleta (~1200 pb).

Uma vez que a expressão transitente do gene *pthA* em folhas de citros já havia sido descrita (Duan *et al.*, 1999), pensou-se em analisar a variação de expressão gênica, dos genes diferenciais obtidos, em folhas de citros transfetadas com o gene *pthA*. Para tanto, foram feitas suspensões de *Agrobacterium* (cepas C58, LBA4404, EHA105 e GV3101) transformadas com os clones pBI121-*pthA*-GFP ($OD_{600nm} \sim 0,3$) em H_2O , para serem infiltradas em folhas de citros, como descrito no ítem infiltração nas folhas no capítulo materiais e métodos. As cepas de *A. tumefaciens* contendo os plasmídios pBI-*pthAs* induziram uma espécie de hipertrofia nas folhas cerca de 40 dias após a infiltração. Porém tais “sintomas” também foram observados nas folhas infiltradas com as cepas controle contendo apenas o vetor pBI121. A observação de que a cepa C58, principalmente, estava induzindo uma espécie de tumor nas folhas de citros inviabilizou nossas análises. Curiosamente, há apenas um relato na literatura

sobre a expressão transiente de genes em folhas de citros através de agrotransfecção, e esse trabalho é justamente o que analisou a expressão de PthA1 (Duan *et al.*, 1999).

Futuramente, serão realizados em nosso laboratório experimentos de transfecção de protoplastos de citros usando-se a proteína PthA recombinante fusionada a um peptídeo sinal carreador (Chang *et al.*, 2005).

5 - Conclusões

- Foram obtidos 17 genes diferencialmente expressos nos tratamentos *Xac* e H₂O após 10 dias de infiltração.
- 14 dos genes apresentaram padrões de expressão semelhante entre as amostras de folhas infiltradas com *Xaa* e *Xac*, que demonstram respostas de patogenicidade distintas em laranja
- A técnica de qPCR demonstrou ser mais eficiente na detecção da expressão de genes pouco expressos quando comparado aos resultados de northern blot.
- A análise dos genes diferencialmente expressos revelou que os mesmos estão envolvidos em vias de transdução de sinal de auxina, tráfico e fusão de vesículas, resposta de defesa e doença, síntese de proteínas e ciclo celular, metabolismo de carbono-nitrogênio e metabolismo secundário.
- A expressão do domínio C-terminal da proteína PthA demonstrou que a mesma se apresenta pouco solúvel, dificultando sua obtenção para ensaios de CD e cristalização.
- A agrotransfecção de folhas de citros com quatro linhagens de *Agrobacterium tumefaciens* (C58, LBA4404, EHA105 e GV3101) contendo o gene *pthA* não foi eficaz.

6. Perspectivas

- Transfecção de protoplastos de citros usando-se a proteína PthA recombinante fusionada a um peptídeo sinal carreador
- Análise da expressão dos genes diferenciais nas amostras de protoplastos transfectados com a proteína PthA
- Obtenção da proteína PthA e formas truncadas para análises estruturais através das técnicas de Dicroísmo circular e cristalografia.

7. Referências Bibliográficas

- ABECITRUS – Associação Brasileira dos Exportadores de Citros. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>> Acesso em fevereiro 2006.
- Aldon D., Brito B., Boucher C., Genin S. (2000) A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J* **19**: 2304-2314
- Alfano, J. R. and Collmer, A. (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol* **179**: 5655-5666
- Al-Mousawi A. H., Richardson P. E., Essenberg M., Johnson W. M. (1982) Ultrastructural studies of a compatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* and cotton. *Phytopathology* **72**: 1222-1230.
- APSnet: The American Phytopathological Society. Agosto/ setembro 2002. Gottwald, T. R., Graham, J. H., and Schubert, T. S. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. Plant Health Progress. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/online/feature/citruscanker>>
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, SP. (1997) Signaling in Plant – Microbe Interactions. *Science* **276**: 726- 733.
- Ballvora, A., Pierre, M., Van den Ackerveken, G., Schornack, S., Rossier, O., Ganal, M., Lahaye, T., and Bonas, U. (2001) Genetic mapping and functional analysis of the tomato Bs4 locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol. Plant-Microbe Interact* **14**: 629-638.
- Batoko, H., Zheng, H.-Q., Hawes, C., and Moore, I. (2000) A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* **12**: 2201–2217.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., Dangl, J. L. (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 391-399.
- Benedetti CE, Arruda P (2002) Altering the expression of the chlorophyllase gene ATHCOR1 in transgenic Arabidopsis caused changes in the chlorophyll-to-chlorophyllide ratio. *Plant Physiol* **128**: 1255-63.
- Bergamin-Filho, A., Amorin, L., Laranjeira, F., Gottwald, T. R., (2000). Epidemiology of citrus canker in Brazil with and without asian citrus leaf miner. International Citrus Canker Research Workshop.
- Bitancourt A. A. (1957) O cancro cítrico. *Biológico* **23**: 101-111.
- Bonas U, Stall R. E., Staskawicz B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *AvrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet* **218**: 127-136.
- Bonas, U., Ackerveken, G. V. (1999). Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Current Opinion in Microbiology* **2**: 94-98.

- Brunings, A. M. and Gabriel, D. W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* **4**(3): 141-157.
- Büttner, D., Bonas, U. (2002) Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J* **21**: 5313-5322
- Büttner, D., Gürlebeck, D., Noël, L. and Bonas, U. (2004) HpaB from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* acts as an exit control protein in type III-dependent protein secretion. *Mol. Microbiol* **54**: 755-768.
- Cao, X., Rogers, S. W., Butler, J., Beevers, L., Rogers, J. C. (2000) Structural Requirements for Ligand Binding by a Probable Plant Vacuolar Sorting Receptor. *Plant Cell* **12**(4): 493-506.
- Cashel, M., Gentry, D. R. Hernandez, V. J. & Vinella, D. (1995) In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, ed. Neidhardt, F.C. (Am Soc. Microbiol., Washington, DC), pp.1458-1496.
- Chan, J. W. Y. F., Goodwin, P. H. (1999) The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Advances* **17**: 489-508.
- Chang, J. H., Goel, A. K., Grant, S. R., Dangl, J. L. (2004) Wake of the flood: ascribing functions to the wave of type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 11-18.
- Chang, M., Chou, J-C, Lee, H-J. (2005) Cellular internalization of fluorescent proteins via arginine-rich intracellular delivery peptide in plant cells. *Plant Cell Physiol* **46**(3): 482-488.
- Cheung A. Y., Chen C. Y., Glaven R. H., de Graaf B. H., Vidali, L., Hepler P. K., Wu H. M. (2002) Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube. *The Plant Cell* **14**: 945-962.
- Choi, M. S., Anderson, M. A., Zhang, Z., Zimonjic, D. B., Popescu, N., Mukherjee, A. B. (2003) Neutral ceramidase gene: role in regulating ceramide-induced apoptosis. *Gene* **315**: 113-122.
- Christie, P. J. and Vogel, J. P. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**(8): 354-60.
- Cornelis, G. R., Van Gijsegem, F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol* **54**: 735-74.
- Cubero, J. and Graham, J. H. (2002) Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(3): 1257-1264.
- Cuvillier, O. (2002) Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1585**: 153-162.
- Da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., *et al*, (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459-463.
- Dangl, J. L. and Jones, J. D. G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411** (6839), 826-833.

- Desimone M, Wagner E, Johanningmeier U. (1998) Degradation of active-oxygen-modified ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by chloroplastic proteases requires ATP-hydrolysis. *Planta* **205**: 459-466.
- Desimone, M., Henke, A., Wagner, E. (1996) Oxidative Stress Induces Partial Degradation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Isolated Chloroplasts of Barley. *Plant Physiol* **111** (3): 789-796.
- Devoto, A., and Turner, J. G., (2003) Regulation of jasmonate-mediated plant responses in arabidopsis. *Ann Bot (Lond)* **92**(3): 329-37.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H. S., Chilcott, C., Zhu, T., Turner, J. G. (2005) Expression profiling reveals COII to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol Biol* **58**(4): 497-513.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-5.
- Diatchenko, L. *et al.* (1996) Suppression Subtractive Hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6025-6030.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y-F, C., Siebert, P. D. (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods in Enzymology* **303**: 349-380.
- Dorey, S., Baillieul, F., Saindrenan, P., Fritig, B., and Kauffmann, S. (1998) Tobacco class I and II catalases are differentially expressed during elicitor induced hypersensitive cell death and localized acquired resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 1102-1109.
- Duan, Y. P., Castañeda, A., Zhao, G., Erdos, G, and Gabriel, D. W. (1999) Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenecity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol Plant-Microbe Interactions* **6**: 556-560.
- Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T. (2000) The generation of plant disease resistance gene specificities. *Trends in Plant Science* **5**(9): 373-379.
- Feys, B. F., Benedetti, C. E., Penford, C.N., and Turner, J. G. (1994) Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759.
- Flor, H. H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296.
- Fouts DE, Badel JL, Ramos AR, Rapp RA, Collmer A (2003) A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Hrp (Type III secretion) deletion mutant expressing the Hrp system of bean pathogen *P. syringae* pv. *syringae* 61 retains normal host specificity for tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **16**: 43-52.
- Fritig, B., Heitz, T., Legrand, M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* **10**: 16-22.

- FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. Disponível em <<http://www.fundecitrus.com.br>> acesso em: fevereiro 2006.
- Gabriel, D. W. (1999a). The Xanthomonas Avr/pth gene family in Plant Microbe Interactions (Stacey, G., Keen, N.T., eds). St Paul, MN: APS Press, pp. 39–55.
- Gabriel, D. W. (1999b) Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiol. Mol. Plant Pathol* **55**: 205–214.
- Givens, R. M., Lin, M. H., Taylor, D. J., Mechold, U., Berry, J. O., Hernandez, V. J. (2004) Inducible expression, enzymatic activity, and origin of higher plant homologues of bacterial RelA/SpoT stress proteins in *Nicotiana tabacum*. *J Biol Chem* **279**: 7495-504.
- Goto, M. (1992) Citrus canker. In: Plant diseases of international importance. Kuman J, Chaube HS, Singh US, Mukhopadyhyan (EDS). Englewood: Prentic –Hall. p.250 –269.
- Gottwald, T. R. and Timmer, L. W. (1995) The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Trop. Agric* **72**: 194–201.
- Gottwald, T. R., Graham, J. H., Civerolo, E. L., Barrett, H. C., and Hearn, C. J. (1993) Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to Citrus canker and citrus bacterial spot determined by mesophyll susceptibility. *Plant Dis* **77**: 1004-1009.
- Graham, J. H. and Gottwald, T. R. (1991) Research perspectives on eradication of citrus bacterial diseases in Florida. *Plant Dis* **75**: 1193–1200.
- Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., Achor, S. D. (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* **5**(1): 1-15.
- Graham, J. H., Gottwald, T.R., Riley, T. D. Bruce, M. A. (1992) Susceptibility of citrus fruit to bacterial spot and citrus canker. *Phytopathology* **82**: 452-457.
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W., Dangl, J. L. (1995) Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**(5225): 843-6.
- Guo, Y., Gan, S. (2006) AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* **46**: 601-612.
- Gürlebeck, D., Szurek, B., Bonas U. (2005). Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *The Plant Journal* **42**: 175–187.
- He, Z., von Caemmerer, S., Hudson, G., Price, G., Badger, M., Andrews, T. (1997) Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase activase deficiency delays senescence of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase but progressively impairs its catalysis during tobacco leaf development. *Plant Physiol* **115**: 1569–1580.
- Hepfer, P. K, Vidali, L., Cheung, A. Y. (2001) Polarized cell growth in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:159-87.
- Hu, G., deHart, Amy.K.A, Li, Y., Ustach, C., Handley, V., Navarre, R., Hwang, Chin-Feng., Aegerter, B. A. Willianson, V.M., Baker, B. (2005) EDS1 in tomato is required for

- resistance mediated by TIR-class R genes and the receptor-like R gene Ve. *The Plant Journal* **42**(3): 376-91.
- Hueck, C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 379-433.
- IAPAR – Instituto agronômico do Paraná
- IEA: Instituto de Economia Agrícola. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em: fevereiro 2006
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., Okada, K. (2001) The DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 2191-209.
- Jauh, G-Y., Phillips, T. E., and Rogers, J. C. (1999) Tonoplast intrinsic protein isoforms as markers for vacuolar functions. *Plant cell* **11**: 1867-1882.
- Johnsson, A., Zeelenberg, L., Min, Y., Hilinski, J., Berry, C., Howell, S. B., Los, G. (2000) Identification of genes differentially expressed in association with acquired cisplatin resistance. *British Journal of Cancer* **83**(8): 1047-1054.
- Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411** (6839): 826-833.
- Jones, J. D. G & Jones, D. A. (1996) The roles of leucine rich repeats in plant defences. *Adv.Bot. Adv. Plant Pathology* **24**: 90-167.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M. A., Denny, T. P. (2002) *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol* **2**: 427-437.
- Kepinski, S., Leyser, O. (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446-51.
- Kirsch, T., Paris, N., Butler, J. M., Beevers, L., Rogers J. C. (1994) Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3403-7.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z., Dangl, J. (2000) Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 73-78.
- Knoop, V., Staskawicz, B. and Bonas. U. (1991) Expression of the avirulence gene *AvrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of *pant* factors. *J. Bacteriol* **173**: 7142-7150.
- Lahaye, T., Bonas, U (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sc.* **6**: 479-485.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., McKnight, S. L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240** (4860): 1759-64.

- Lawson, R. H, Dienelt, M. M, Civerolo, E. L. (1989) Histopathology of *Xanthomonas campestris* pv *citri* in Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia*: light and scanning electron microscopy. *Phytopathology* **79**: 329-33.
- Leite, Jr. R.P., and Mohan, S. K. (1990) Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. *Crop Protection* **9**: 3-7.
- Liang, P., Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**(5072): 967-71.
- Lindgreen, P. B., Jakobek, J. L., Smith, J. A. (1992) Molecular analysis of plant defense responses to plant pathogens. *Journal of Nematology* **24** (3): 330-337.
- Lindgreen, P. B., Peet R. C., Panapolos N. J. (1986) *J Bacteriology* **168**: 512-522.
- Lipka, V. and Panstruga, R. (2005) Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. **8**: 625-631.
- Livak, K. J and Schmittgen, T. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Marathe R, Dinesh-Kumar, S. P. (2003) Plant defense: one post, multiple guards?! *Mol. Cell* **11**: 284-286.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (2002) The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant Microbe Interact* **15**: 637-646.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J., Sessa, G. (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Ann. Rev. Plant Biol* **54**: 23-61.
- Melchers L. S., Stuiver M. H. (2000) Novel genes for disease-resistance breeding. *Curr Opin Plant Biol* **3**(2):147-52.
- Meyers, B. C., Kozic, A., Griego, A., Kuang, H., Milchemore, R. W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **15**: 809-834.
- Michelmore R. W and Meyers B. C. (1998) Clusters of resistance genes in plant evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Research* **8**: 1113-1130.
- Minsavage G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearney, B., Bonas, U., Staskawicz, B. J., Stall, R. E. (1990) Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**: 41-7.
- Monge-Astua, G., Astua-Freitas, J., Bacocina, G., Roncoletta, J., Carvalho, S. A., Machado, M. A. (2004) Expression Profiling of Virulence and Pathogenicity Genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J. Bacteriol* **187**(3):1201-1205.
- Morel, J. B., and Dangl, J. L. (1997) The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death Differ* **4**: 671-683.

- Moreno, J. I., Martin, R., Castresana, C. (2005) SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J* **41**(3):451-63.
- Moskovitz, J., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jursky, F., Weissbach, H., Brot, N. (1996a) Chromosomal localization of the mammalian peptide-methionine sulfoxide reductase gene and its differential expression in various tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3205-3208.
- Mysore, K. S., Crasta, O. R., Tuori, R. P., Folkerts, O., Swirsky, P. B., Martin, G. B. (2002) Comprehensive transcript profiling of Pto- and Prf-mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. *Plant J* **32**: 299-315.
- Nakamichi, N., Kita, M., Ito, S., Sato, E., Yamashino, T., Mizuno, T. (2005) The Arabidopsis pseudo-response regulators, PRR5 and PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function. *Plant Cell Physiol* **46**(4): 609-19.
- Namekata, T., Rossi, A. C., Cerávolo, L. C. (1996) Avaliação de novos métodos de erradicação do cancro cítrico. *Laranja* **17**: 67-78.
- Negrutskii, B. S., and El'skaya, A. V. (1998) Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **60**: 47-78.
- Neves, E. M., Dayoub, M., Dragone, D. S., Neves, M. F. (2001) Citricultura brasileira: Efeitos econômicos-financeiros. *Rev. Bras. Fruticultura* **23**(2): 432-436.
- Oh, S. A., Park, J. H., Lee, G. I., Paek, K. H., Park, S. K., Nam, H. G. (1997) Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **12**: 527-535.
- Ohnishi, T., Sugahara, S., Yamada, T., Kikuchi, K., Yoshida, Y., Hirano, H. Y., Tsutsumi, N. (2005) OsNAC6, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice. *Genes Genet Syst* **80**: 135-9.
- Okita, T. W. (1996) Compartmentation of proteins in the endomembrane system of plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 327-50.
- Paris, N., Rogers, J. C. (1996) The role of receptors in targeting soluble proteins from the secretory pathway to the vacuole. *Plant Physiol Biochem* **34**: 223-227.
- Paris, N., Rogers, S. W., Jiang, L., Kirsh, T., Beevers, L., Phillips, T. E, Rogers, J. C. (1997) Molecular cloning and further characterization of a probable plant vacuolar sorting receptor. *Plant Physiol* **115**: 29-39.
- Paris, N., Stanley, C. M., Jones, R. L., Rogers, J. C. (1996) Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments. *Cell* **85**: 563-572.
- Pham, X. H., Reddy, M. K., Ehtesham, N. Z., Matta, B. & Tuteja, N. (2000) A DNA helicase from *Pisum sativum* is homologous to translation initiation factor and stimulates topoisomerase I activity. *Plant J* **24**: 219-229.
- Reinbothe, Mollenhauer, S. B. and Reinbothe, C. (1994) JIPs and RIPs: The Regulation of Plant Gene Expression by Jasmonates in Response to Environmental Cues and Pathogens. *Plant Cell* **6**: 1197-1209.

- Ribeiro, J. G. B. (1983) Manual Operativo. Campanha Nacional de Erradicação do Cancro cítrico CANECC, Brasília/DF. p 22.
- Riechmann, J. L and Ratcliffe, O. J. (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 423-434.
- Riechmann, J. L and Ratcliffe, O. J. (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 423-434.
- Ro, Dae-Kyun, Arimura, Gen-Ichiro, Stephen Y. W., Piers, L. E., Bohlmann, J. (2005) Loblolly pine abietadienol_abietadienal oxidase PtAO (CYP720B1) is a multifunctional, multisubstrate cytochrome P450 monooxygenase. *PNAS* **102**(22): 8060–8065.
- Robertson, M. (2003) Increased dehydrin promoter activity caused by HvSPY is independent of the ABA response pathway. *Plant J.* **34**: 39-46.
- Robertson, M. (2004) Two transcription factors are negative regulators of gibberellin response in the HvSPY-signaling pathway in barley aleurone. *Plant Physiol* **136**: 2747-61.
- Rodrigues Neto J., Baldini Ribeiro J. G. (2002) Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico. Editado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento /SDA/DDIV – Brasília
- Sablowski RW, Meyerowitz EM (1998) A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* **92**:93-103
- Sadanandom, A., Poghosyan, Z., Fairbairn, D. J., and Murphy, D. J. (2000) Differential regulation of plastidial and cytosolic Isoforms of peptide methionine sulfoxide reductase in Arabidopsis. *Plant Physiology* **123**: 255–263.
- Salome, P. A., McClung, C. R. (2005) PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7 and 9 are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the Arabidopsis circadian clock. *Plant Cell* **17**(3):791-803.
- Sambrook, J. Russel, D. W. (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, Ed 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Plaxton, W. C. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-7.
- Santos, C. F. O. (1983) Cancro cítrico no Brasil – esforços governamentais visando sua erradicação. *Laranja* **4**: 211-220.
- Schjoerring, J. K, Mack, G., Nielsen, K.H., Husted, S., Suzuki, A., Driscoll, S., Boldt, R., Bauwe, H. (2006) Antisense reduction of serine hydroxymethyltransferase results in diurnal displacement of NH assimilation in leaves of *Solanum tuberosum*. *Plant J* **45**: 71-82.
- Schubert, T. S., Rizvi, S. A., Sun, X., Gottwald, T. R., Graham, J. H. and Dixon, W. N. (2001) Melting the challenge of erradicating citrus canker in Florida again. *Plant Dis.* **85**: 340-356.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemeyer, M., Dixon, J. E, Innes, R. W. (2003) Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**(5637):1230-3.

- Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M., Alvarenga, R., Alves LMC *et al* (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **406**: 151-159.
- Sperling, P., Heinz, E. (2003) Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. *Biochim Biophys Acta* **1632**(1-3): 1-15.
- Staskawicz, B. J. (2001) Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology* **125**: 73-76.
- Sugiura, M., Sakaki, T., Yabusaki, Y., Ohkawa, H. (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* of a novel tobacco cytochrome P-450-like cDNA. *Biochim Biophys Acta* **11**, **308**(3):231-40.
- Swarup, S., De Feyter, R., Bransky, R. H., Gabriel, D. W. (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology* **81**: 802-9.
- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M. T., Gabriel, D. W. (1992) An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Molecular Plant Microbe Interact* **5**(3):204-13.
- Swings, J. G., Civerolo, E. L., *Xanthomonas*. Chapman & Hall, London, 1993, 25-30.
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U. and Van den Ackerveken, G. (2001) Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J* **26**: 523-534.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., and Bonas, U. (2002) Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol Microbiol* **46**: 13-23.
- Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001) Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews* **81**(1): 153-208.
- Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y., Martin, G. B. (1996) Physical interaction of AvrPto and Pto kinase defines a recognition event involved in plant disease resistance. *Science* **274**: 2060-2063.
- Tisdale, E. J. (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Is Required for Vesicular Transport in the Early Secretory Pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **276**(4): 2480-2486.
- Torii, K. U. (2004) Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *International Review of Cytology* **234**: 1-45.
- Tran, L. S., Nakashima, K., Sakuma, Y., Simpson, S. D., Fujita, Y., Maruyama, K., Fujita, M., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2004) Isolation and functional analysis of *Arabidopsis* stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* **16**: 2481-98.
- Tuteja, N. and Tuteja, R. (2004) Prokaryotic and eucaryotic DNA helicases. Essential molecular motor proteins for cellular machinery. *Eur J Biochem* **271**: 1835-1848.

- Van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U. (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell* **87**: 1307-1316.
- van der Biezen, E. A., Sun, J., Coleman, M. J., Bibb, M. J., Jones, J. D. (2000) Arabidopsis RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3747-52.
- Vernière, C., Hartung, J. S., Pruvost, O. P., Civerolo, E. L., Alvarez, A. M., Maestri, P., Luisetti, J. (1998) Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 477-487.
- Verwoerd, T. C., Deckker, B. M. Hoekema, M. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plants RNAs. *Nucleic Acids Research* **17**(6).
- Xia, Yiji. (2004) Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cellular Microbiology* **6**: (10), 905-913.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., Chua, N. H. (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* **14**: 3024-36.
- Yang, Y., De Feyter, R., Gabriel, D. W. (1994) Host-specific symptoms and increase release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv *malvacearum* from leaves are determined by the 102bp tandem repeats of *pthA* and *Avrb6*, respectively. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**: 345-355.
- Yang, B., Zhu, W., Jonhson, L.B., and White, F.F. (2000) The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double stranded DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 9807-9812.
- Yang, Y., Gabriel, D. W. (1995b) *Xanthomonas* avirulence/pathogenecity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe Interact* **8**: 627-631.
- Zhu, W., Yang, B., Chittoor, J. M., Johnson, L. B., and White, F. F. (1998) AvrXa10 contains an acidic transcriptional activation domain in the functionally conserved C terminus. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 824-832.