

FABIANA HELENA FORTE GOMES

**“ANÁLISE DE REGIÃO DO PROMOTOR DO GENE *CsEXP*
COMO UM DOS POSSÍVEIS LOCAIS DE INTERAÇÃO
GENÉTICA NO DESENVOLVIMENTO DO CANCRO CÍTRICO
ENVOLVIDO NA SINALIZAÇÃO DE AUXINA E ESTUDOS DA
PROTEÍNA *CsARF* de *Citrus sinensis*”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

FABIANA HELENA FORTE GOMES

“Análise de região do promotor do gene CsEXP como um dos possíveis locais de interação genética no desenvolvimento do cancro cítrico envolvido na sinalização de auxina e estudos da proteína CsARF de *Citrus sinensis*”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Fabiana Helena Forte Gomes
José Camillo Novello
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestra em
Biologia Funcional e Molecular,
na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Camillo Novello

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G585a Gomes, Fabiana Helena Forte, 1985-
Análise de região do promotor do gene CsEXP como um dos possíveis locais de interação genética no desenvolvimento do cancro cítrico envolvido na sinalização de auxina, e estudos da proteína CsARF de *Citrus sinensis* / Fabiana Helena Forte Gomes. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: José Camillo Novello.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cancro cítrico. 2. Plantas - Efeito da auxina. 3. Expansinas. 4. Proteína PthA. 5. *Citrus sinensis*. I. Novello, Jose Camillo, 1955-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of promoter region of the gene CsEXP as one of the possible sites of interaction genetic in citrus canker development involved in signaling auxin pathway, and studies of CsARF protein from *Citrus sinensis*

Palavras-chave em Inglês:

Citrus canker

Plants - Effect of auxin

Expansins

PthA protein

Citrus sinensis

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

José Camillo Novello [Orientador]

Miriam Verginia Lourenço

Marcos Rodrigo Alborghetti

Data da defesa: 18-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas 18 de Março de 2013

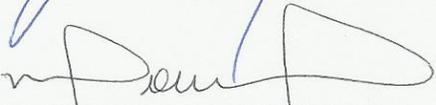
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Camillo Novello (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Miriam Verginia Lourenço



Assinatura

Profa. Dra. Marcos Rodrigo Alborghetti



Assinatura

Dra. Daniela Carla da Silva Damico

Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

Assinatura

“Summer Song”
Joe Satriane

Dedico este trabalho à minha amada família;

Aos meus irmãos Valdério Forte Gomes, Patrícia Forte Gomes

e Alexandre Forte Gomes, também ao meu sobrinho

Ian Forte Furlan, à minha mãe Claremi M. Forte Gomes,

à minha irmã-amiga Ariane da Silva Furlan

e ao meu pai José Vandério Gomes *in memoriam*.

Agradecimentos:

Ao meu orientador, o professor Dr. José Camillo Novello que me ajudou imensamente em um momento tão difícil, que contribui orientando, ajudando e apoiando os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ao meu irmão Valdério por ter sido sempre um grande amigo, conselheiro, educador e incentivador, sempre esteve ao meu lado e contribuiu me incentivando a lutar por meus sonhos. E também por ser tão inteligente e justo.

À minha grande amiga Ariane Furlan por me ajudar tanto, muito mesmo, a quem eu sou muito grata por tudo, por estar sempre comigo, e que contribuiu diretamente em todos os sentidos para com este trabalho. É minha amiga irmã sempre.

À minha irmã Patrícia por ser também uma educadora incentivadora amiga que sempre me apoiou e esteve comigo em todos os momentos. E que fez em minha vida muitas memórias agradáveis.

Ao meu irmão Alexandre que também me educou e me ensinou a ver o lado mais doce da vida, com um senso de humor e uma bondade única, é uma pessoa maravilhosamente agradável.

Ao meu sobrinho Ian que é tão mágico e que me surpreende tanto, meu grande amigo que me faz feliz!

À minha mãe que mais recentemente se tornou minha amiga e que também me ensina muitas coisas, está sempre comigo em tudo apoiando meus planos.

Ao meu namorado Felipe por estar sempre comigo nestes quatro anos de namoro, por me apoiar e torcer por mim, ser além de namorado um grande amigo, também agradeço a sua família pelo apoio.

Ao André Pereira por ser meu orientador e grande amigo que sempre me ensinou todas as coisas no laboratório e sempre me ajudou e incentivou e esteve comigo em todos os momentos.

Ao Marcel Nakahira, por ter sido sempre meu grande amigo que diretamente me apoiou e esteve junto comigo para me ajudar. E também por ser tão excentricamente correto!

À Fernanda Basei por ser uma grande amiga e conselheira, por ser tão adorável e única. E também ao Andrey.

À minha amiga Ângela Saito, que também sempre me ajudou e aconselhou.

Ao meu amigo Tiago Souza por ter me ajudado e ensinado e ter contribuído com este trabalho. Também por ter ido ao laboratório me ensinar depois de um dia de trabalho dispondo do seu tempo para me ajudar.

Aos demais amigos do laboratório: Priscila Zenatti, Gabi Meireles, Germana, Dr. Jörg, Alisson, Vanessa Bomfim, Vanderlei técnico, Daniel M.T., Deivid Migueleti, Eduardo, Leandro entre outros.

À minha querida amiga Geisy a quem eu tenho imensa consideração. Foi Deus que fez a gente morar juntas! Obrigada por tudo Geisy!!

À Kátia que também é uma grande amiga que morou comigo, uma pessoa meiga e realmente diferente e agradável em todos os sentidos.

Aos meus amigos da UNESP, os bio-indicadores: Rafael Damasceno, que sempre foi meu amigo e parceiro favorito para fazer os trabalhos! A Vera que ilumina todos os ambientes com sua alegria! A Juliana que sempre tornou todas as coisas mais meigas, a Paty tão inteligente, adorável e companheira e a Melina que com sua grande sabedoria sempre colocou todas as coisas no lugar.

Aos meus amigos do noturno: meu querido amigo Abner, sempre tão inteligente e com um coração tão bom, uma pessoa tão divertida um grande amigo que quero sempre ter como amigo, a minha querida amiga Jana que passou todos os intervalos comigo, inteligente até demais, devo muitas notas à Jana!! Ao Falco, à Michele e à Paty.

Aos meus amados “bichos”: Brunão “Koala”, Silvia Natso, Estela Yukari e Sindy por serem amigos tão divertidos.

Aos meus amigos engenheiros: Otávio Corsi e Luís por serem tão adoráveis e terem me feito tão feliz na UNESP.

À Mariana que me acompanhou na iniciação científica e sempre foi uma boa amiga.

Aos meus amigos do passado e de sempre José Lorenzi, Santiago Nunes e Ricardo por serem sempre meus amigos de sempre.

À minha amiga Terezinha por ter ajudado na minha criação durante a minha infância e ser uma boa amiga.

Aos meus amigos alemães por me ajudarem com o doutorado na Alemanha Theo e Toft!

À professora doutora Carmen Verissimo Ferreira Halder e à Andréia Aparecida Vigilato dos Santos pela postura ética prestada.

À Andréia pela amizade e carisma e por ser o anjo da pós-graduação.

Agradeço a todos os funcionários da pós-graduação.

À Adriana da ouvidoria da UNICAMP que me ajudou muito.

À minha psicóloga Maria pela ajuda.

Ao meu advogado o Dr. Marcos por ter me apoiado, aconselhado e ajudado.

À Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, uma excelente instituição.

Aos membros da banca:

Ao meu orientador Dr. Camillo Novello por ter me ajudado tanto; pela orientação, ajuda correções e apoio. Ao professor Dr. Claudio Werneck pela ajuda prestada. Por ter corrigido o boneco de dissertação por ter me ajudado a elaborar uma aula universitária, e por agendar para mim uma reunião referente ao experimento de microarranjo, ajudas que foram de grande contribuição a este trabalho. Ao Marcos Rodrigo Alborghetti um grande pesquisador, pela dedicação na correção que foi de enorme contribuição a este trabalho e pela ajuda e aconselhamento para elaboração da aula e finalmente pela amizade e ajuda no laboratório. À professora Dra. Miriam Lourenço excelente profissional pela disposição em ser membro da banca e pelas correções e conselhos que foram valiosos para este trabalho. Ao professor Dr. Hiroshi por aceitar ser suplente da banca e por ser um excelente professor o qual eu gostei muito de participar das aulas. E a Dra. Daniela Damico pelas correções, valiosas críticas e sugestões que contribuíram em muito com este trabalho.

Este trabalho foi financiado pela “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” FAPESP durante um ano e meio.

Este trabalho foi financiado pelo “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq) durante o último semestre.

Foram usadas as dependências do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

Sumário

1	Introdução.....	1
1.1	O cancro cítrico e a produção de citros no Brasil	1
1.2	Interação planta-patógeno na cancrose	5
1.3	Sistema de defesa vegetal	13
1.4	A auxina é necessária para o desenvolvimento do cancro.....	13
1.5	A instauração da doença está ligada a ativação de hormônios no hospedeiro	16
1.6	A proteína " <i>Auxin Response Factor</i> " (ARF)	18
2	Justificativas.....	22
3	Objetivos:	22
3.1	Geral.....	22
3.2	Específico.....	22
4	Procedimento Experimental	23
4.1	Clonagens de <i>Csarf</i> e da região mínima do promotor <i>Csexp</i> de citros.....	23
4.2	Eletroforese em Gel de Agarose	26
4.3	Purificação de DNA	26
4.4	Reações de ligação.....	26
4.5	Transformação de bactérias competentes por choque térmico.....	27
4.6	Extração de DNA Plasmidial - minipreparação.....	27
4.7	Confirmações dos clones obtidos	27
4.8	" <i>Western Blotting</i> "	28
4.9	Expressão e purificação de proteínas PthAs	29
4.10	Expressão de <i>CsARF</i> em extrato de reticulócitos de coelho	29
4.11	" <i>Gel Shift Assays – EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)</i> "	30
4.12	Origem e preparação do material vegetal	31
4.13	Condições de cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
4.14	Transformação genética com <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
4.15	Ensaio histoquímico da atividade GUS.....	32
4.16	Ensaio fluorimétrico da atividade GUS	33
4.17	Medida de proteínas totais dos extratos de epicótilos	33
4.18	Ferramentas de Bioinformática	33

5	<i>Resultados e discussões</i>	34
5.1	Clonagem da região promotora mínima CsEXP	34
5.2	Confecção de oligonucleotídeos para ensaio Gel “Shift” com as proteínas CsARF e PthA2	38
5.3	Clonagens de CsARF.....	43
5.4	Ensaio colorimétrico de atividade da β -glucuronidase em epicótilos de laranja doce	45
5.5	Teste de fluorescência para medição da ativação da expressão de GUS em epicótilos de laranja doce	48
5.6	Transformação transiente em folhas de tabaco: incubação por 48 horas e por 72 horas	50
5.7	Expressão da proteína CsARF em reticulócitos de coelho	55
5.8	Expressão da proteína PthA2.....	56
5.9	Ensaio gel “shift” para proteína CsARF	57
5.10	Ensaio gel “shift” com a proteína PthA2.....	58
5.11	Ensaio gel “shift” de competição do “box” CsEXP contra a sonda predita PR5-Comp2.....	60
6	<i>Análise dos resultados para o ensaio gel “shift”</i>	61
7	<i>Dificuldades e soluções</i>	62
8	<i>Conclusão</i>	62
9	<i>Perspectivas</i>	62
10	<i>Bibliografia</i>	63

Lista de Abreviações

2,4D- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

ABP1 “*auxin-binding protein 1*”

AD- “*acidic transcription activator-like domains*”.

AIA- Ácido indol-3-acético.

ANA- Ácido naftaleno-acético.

ARF- família de proteínas “*auxin response factor*” ou fatores responsivos à auxina.

Aux/IAA- “*Auxin/indole-3-acetic acid*”.

AuxRE- “*auxin response element*” ou elemento responsivo à auxina.

AuxRE “*box*”-Elemento responsivo à auxina que consiste na sequência TGTCTC.

Avr- “*avirulence*”.

AvrBs3/PthA- Uma família de proteínas que são fatores de transcrição (“*transcription activator-like*” ou TAL).

CsEXP- Promotor de expansina de Citros (*Cs*: Citros).

CsEXP mínimo- Promotor de expansina de Citros, região mínima promotora.

CVC- Clorose Variegada dos Citros.

DNA- Ácido desoxirribonucléico “*deoxyribonucleic acid*”.

DTT- Ditioneitol “*dithiothreitol*”.

EDTA- Ácido etilendiamino tetra-acético “*ethylenediamine tetraacetic acid*”.

EMSA- Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética “*electrophoretic mobility shift assay*”.

ETI- “*effector-triggered immunity*”.

FAO- Organização sobre alimentos e agricultura “*Food and Agriculture Organization*”.

Fundecitros- Fundo de Defesa da Citricultura.

GUS- Gene que expressa β -glucuronidase.

HBL- huanglongbing ou “*greening*”.

HR- “*hypersensitive response*” ou resposta de hipersensibilidade”.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IPTG – “*Isopropyl β -D-1 thyogalactopiranoside*”.

Kb – Kilobases.

MAPK- (quinase ativada por mitógenos)

MS (MURASHIGE e SKOOG)

MT (MURASHIGE e TUCKER)

NB-LRR- (“*nucleotide-binding leucine rich repeats*”).

NLS- “*nuclear localization signals*”.

OD- Densidade ótica “*optical density*”.

pb – Par de base.

PCR – “*Polimerase Chain Reaction*”.

PMSF- Fluoreto de fenilmetalsulfonila “*phenylmethanesulphonylfluoride*”.

pthA- (pth “*peptidyl-tRNA hydrolase*” A “*Avirulence*”)- gene.

PthA- (pth “*peptidyl-tRNA hydrolase*” A “*Avirulence*”)- proteína.

PTI- “*PAMP-triggered immunity*”.

RNA- Ácido ribonucléico “*ribonucleic acid*”.

RNA^t - Ácido ribonucléico transportador “*ribonucleic acid*”.

RVD- “*repeat-variable diresidues*” ou repetitivos e variáveis diresíduos.

SDS-PAGE – “*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*”.

TATA-“*box*”- É também chamado “Goldberg Hogness-*box*” é um elemento cis-regulatório que consiste na sequência de DNA 5'-TATAAA-3'.

Upa “*box*”- genes “*up*”-regulados por AvrBs3 “*upregulated by AvrBs3*”.

WRKY- Fatores de transcrição caracterizados por um domínio conservado na sequência proteica do tipo WRKYGQK.

Xac- *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ou *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc ou *X. citri*).

Xcc ou *X. citri*- *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Xcv- *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Resumo

O Brasil é o maior produtor de citros no mundo, entretanto, várias doenças ameaçam a citricultura brasileira, dentre elas o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc). A doença é caracterizada por necrose e lesões eruptivas. Sabe-se que a bactéria transloca proteínas efetoras para o interior da célula hospedeira e modula a transcrição na planta. Dentre as proteínas translocadas está a proteína PthA que por si só é capaz de induzir hiperplasia e hipertrofia tecidual. Em relação aos genes cuja expressão foi induzida pela infecção por *X. citri* estão aqueles envolvidos na remodelação da parede celular, síntese, mobilização e sinalização de auxina e giberelina, os quais são os principais hormônios vegetais controladores de crescimento celular. Corroborando com isso, tanto auxina como giberelina ativam a expressão de celulases e expansinas e são necessárias para o desenvolvimento do cancro cítrico. Em 2010 demonstrou-se a interação entre PthAs e a proteína ARF (“*auxin response fator*”) de *Citrus sinensis* (CsARF), um possível repressor da via de auxina. O promotor do gene da expansina de citros (CsEXP), cujo gene foi induzido por *X. citri* e auxina, contém uma sequência similar aos chamados AuxRe, elementos cis-regulatórios de resposta à auxina, localizado adjacientemente ao provável TATA-“*box*”. Sendo assim, analisou-se a região 5’ a montante do gene CsEXP de *C. sinensis* a fim de saber se este representa de fato o promotor mínimo do gene e se o “*box AuxRE-like*” funciona como elemento regulatório de resposta à auxina. No ensaio de transformação de CsEXP para ativação do gene repórter GUS, a região promotora foi responsiva à auxina, havendo portanto uma regulação positiva do gene pelo hormônio. Há uma interação (sinergismo) entre a proteína PthA2 e/ou PthA4 com auxina na regulação da transcrição. Esta região que contém o “*box AuxRE-like*” possui uma sequência TGTCTA a qual está justaposta ao possível TATA-box no promotor do gene podendo se tratar de uma região de provável co-interação entre as duas proteínas. As proteínas CsARF e PthA2, em ensaios gel “*shift*”, demonstraram afinidade por esta região, o que corrobora com a hipótese de co-interação nessa região. Os resultados demonstram que esta região do DNA mostra-se como importante alvo de estudo, envolvendo interações correlacionadas com o desenvolvimento da doença.

Abstract

Brazil is the biggest in the world in the citrus production, but many diseases threaten the Brazilian citrus cultivation, among them the citric canker, a disease characterized by hyperplastic lesions on the host surface, having *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) as the causal agent of citrus canker. It is known that the bacterium translocates effector proteins into the host cell to modulate transcription in the plant, including the PthA protein which itself is capable of inducing tissue hyperplasia and hypertrophy. Recently, it was shown that *X. citri* induces the expression of genes involved in cell wall remodeling, synthesis, mobilization and signaling of auxin and gibberellic acid, main plant hormones controlling cell growth and division. Furthermore, auxin and gibberellin are capable to activate the expression of cellulases and expansins and both of them are necessary for the development of citrus canker. Moreover, we verified the interaction between PthA and the protein ARF (auxin response factor) of *Citrus sinensis* (CsARF), and that promoter of the gene of expansins citrus (CsExp) it was induced by *X. citri* and auxin, which contains a sequence similar to known AuxRe, cis-regulatory elements in response to auxin, located adjacent to the probable TATA-box. Therefore, we analyzed the 5' region upstream of the gene CsExp of *C. sinensis* in order to know if in fact represents the minimal promoter of the gene and if AuxRE-box-like functions as regulatory element in response to auxin. In the test transformation of CsEXP for activating GUS, the promoter region was responsive to auxin, the results were promising, because the minimal promoter of the gene was responsive to auxin *in vivo* assays, which have confirmed the activation of the reporter gene by auxin, with therefore an upregulation of the gene by the hormone. There is a synergy between the proteins PthA2 and PthA4 with auxin in the regulation. This region contains the AuxRE-like-box which has a sequence TGTCTA which is juxtaposed to the potential TATA-box within the promoter of the gene, possibly being a region of likely joint-interaction for the two proteins. PthA2 and CsARF Proteins in gel shift tests demonstrated affinity for this region, which could confirms the hypothesis of the region to be a region of joint-interaction. The results were significant and this region of the DNA shown to be an important target for study of interactions likely correlated with the development of the disease.

1 Introdução

1.1 O cancro cítrico e a produção de citros no Brasil

A importância do estudo de doenças que prejudicam a produção de citros no Brasil se dá devido ao fato do país ser o maior produtor de citros no mundo (BARBOSA-MENDES, 2009; Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos, 2011). O *Ranking* elaborado pela “*Food and Agriculture Organization*” (FAO), em 2013: são mostrados os outros países que apresentam posição de destaque na produção de laranja no mundo com o Brasil na liderança (tabela 1).

Tabela 1: A colocação entre os vinte principais países produtores de citros no mundo, com o Brasil na primeira posição. Dados obtidos do (FAO) em 2013:

Rank	Area	Production (Int \$1000)	Production (MT)
1	Brazil	3498298	18101700
2	United States of America	1445167	7477920
3	India	1153054	5966400
4	China	966925	5003289
5	Mexico	783009	4051630
6	Spain	602965	3120000
7	Egypt	464016	2401020
8	Italy	462593	2393660
9	Indonesia	392101	2028900
10	Turkey	330567	1710500
11	Pakistan	290853	1505000
12	Iran (Islamic Republic of)	290432	1502820
13	South Africa	273380	1414590
14	Morocco	164114	849197
15	Argentina	161077	833486
16	Greece	148808	770000
17	Algeria	143010	740000
18	Viet Nam	140962	729400
19	Syrian Arab Republic	129270	668900
20	Ghana	107470	556100

MT: Milhões por toneladas. Int \$ 1000: preços internacionais passados para mil dólares.

Segundo estatísticas do IBGE em 2012 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) São Paulo é o principal produtor de laranja dentre todos os estados brasileiros (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de laranja nos estados brasileiros:

Maiores produtores de laranja em 2012	
Estado	Produção de laranja (%)
São Paulo	76,1
Bahia	5,31
Minas Gerais	4,54
Sergipe	4,3
Outros	9,68

Esta produção tem um importante papel na economia do país. A produção da laranja é uma atividade agrícola moderna que está hoje sob o comando técnico-científico das grandes empresas que atuam no setor de sucos (Citrosuco, Cutrale, Citrovita, Coinbra/Dreyfuss e Cargill¹, entre outras) (TOLEDO, 2008).

Data a importância do cultivo de laranja muitas doenças que ameaçam a citricultura como CVC (Clorose Variegada dos Citros), a pinta-preta, a leprose, o cancro cítrico e o “*greening*” ou “*huanglongbing*” (HLB), sendo a última, a doença de maior relevância no cenário atual são importantes alvos de estudo. O ano de 2012 caracterizou-se, entretanto, pelas imensas perdas na citricultura paulista devido ao excesso de estoques de sucos concentrados nas indústrias, reduzindo a comercialização das frutas, que acabaram por apodrecer nos pomares. Além disso, a crise no Mercado Europeu e as sanções comerciais impostas pelos Estados Unidos da América, grandes compradores do suco brasileiro, são apontadas como responsáveis pelos prejuízos à citricultura nacional (IBGE, 2012). Somando-se aos desentendimentos econômicos causados por guerras de preços entre os citricultores e as empresas além das doenças que afetam os citros encontram-se como os principais fatores que afetam a produção de citros na atualidade do Brasil.

O cancro cítrico é uma doença relevante em citros, pois não tem cura, é de fácil disseminação e não existem variedades comerciais de citros resistentes à bactéria causadora. No Estado de São Paulo, atual detentor da maior produção de citros no país, a doença tem sido controlada principalmente através de um programa de erradicação das plantas contaminadas (BARBOSA-MENDES, 2009). A legislação que obteve sucesso no controle do cancro cítrico (BELASQUE, 2009) determinava que se o número de árvores doentes fosse menor que 0,5% do talhão, seriam erradicadas as plantas-foco e as que estiverem em um raio de 30 metros destas plantas. Caso o número de árvores doentes

ultrapasse 0,5% do talhão, todo este deveria ser erradicado (DIÁRIO OFICIAL, 1999). Porém houve uma mudança na legislação sobre cancro cítrico através da Resolução SAA-43 (Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo que altera a estratégia adotada no combate ao Cancro Cítrico). Tal mudança na legislação paulista desobriga a erradicação de todas as plantas do talhão que apresentar mais de 0,5% de infestação sendo agora obrigada a erradicar não mais todo o talhão, mas sim 30 metros ao redor das plantas-foco. A incidência de cancro cítrico já aumentou, passou de 0,14% para 0,44% nos talhões do parque citrícola paulista em 2010. As informações são do levantamento amostral realizado pelo Fundo de Defesa da Citricultura. Em 1999, primeiro ano da realização do trabalho, o índice era de 0,70% (Fundecitrus, 2012).

O cancro cítrico asiático é uma doença com distribuição mundial e gera um impacto econômico grave para a indústria de citros (CARDOSO, 2010). Em algumas regiões, a doença é endêmica, onde a alta temperatura, chuva, umidade e vento, representam condições de ambientes favoráveis para a disseminação da bactéria (KHALAF, 2011), como é o caso do sul do Brasil e da Flórida, outra relevante produtora de citros (BEHLAU, 2010). Esta doença é caracterizada por necrose, lesões circulares e eruptivas nas folhas, caules e frutos que se tornam elevadas como pústulas à medida que a infecção progride (figura 1). Infecções severas causam desfolhação, frutos deteriorados, queda prematura de frutos e hiperplasia no tecido (GOTTWALD, 2002; BRUNINGS e GABRIEL, 2003; FRANCIS, 2009; BUTTNER e BONAS, 2010). A contaminação ocorre via estômatos e/ou pequenos ferimentos na epiderme da planta. Além disso, fatores bióticos e abióticos podem facilitar a infecção e disseminação da bactéria, como tempestades, podas com ferramentas contaminadas e insetos herbívoros, como é o caso da larva minadora do citros (*Phyllocnistis citrella*), que gera galerias no mesófilo foliar favorecendo penetração do patógeno (BELASQUE JR., 2001; BUTTNER e BONAS, 2010).

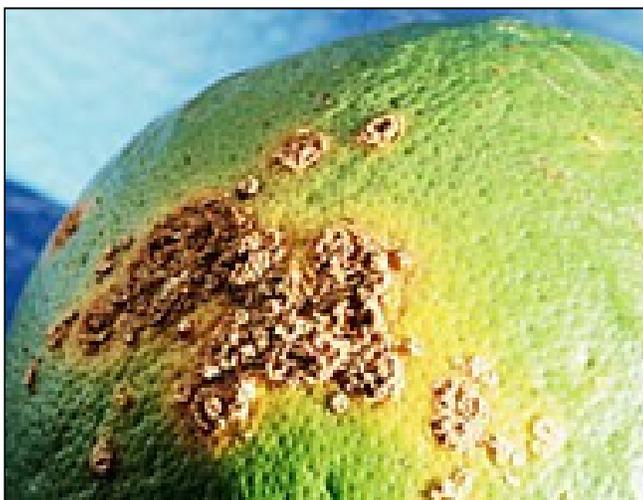


Figura 1: Sintomas característicos do cancro cítrico afetando fruto. Foto de Fundecitrus.

Além da erradicação, o citricultor pode utilizar medidas preventivas adicionais que incluem a produção de mudas sadias em viveiros livres da doença, instalação de quebraventos e a aplicação de bactericidas à base de cobre. Embora os bactericidas cúpricos sejam eficientes para reduzir a população bacteriana na superfície foliar, longos períodos de uso favorecem a resistência da bactéria ao cobre e à poluição ambiental. Assim, para obter maior eficiência, as diferentes estratégias de controle são empregadas conjuntamente. Contudo, essas medidas são apenas preventivas, não curativas e, além de não gerarem aumento significativo na produtividade, acabam por onerar o citricultor (BEHLAU, 2008, 2010; FRANCIS, 2009).

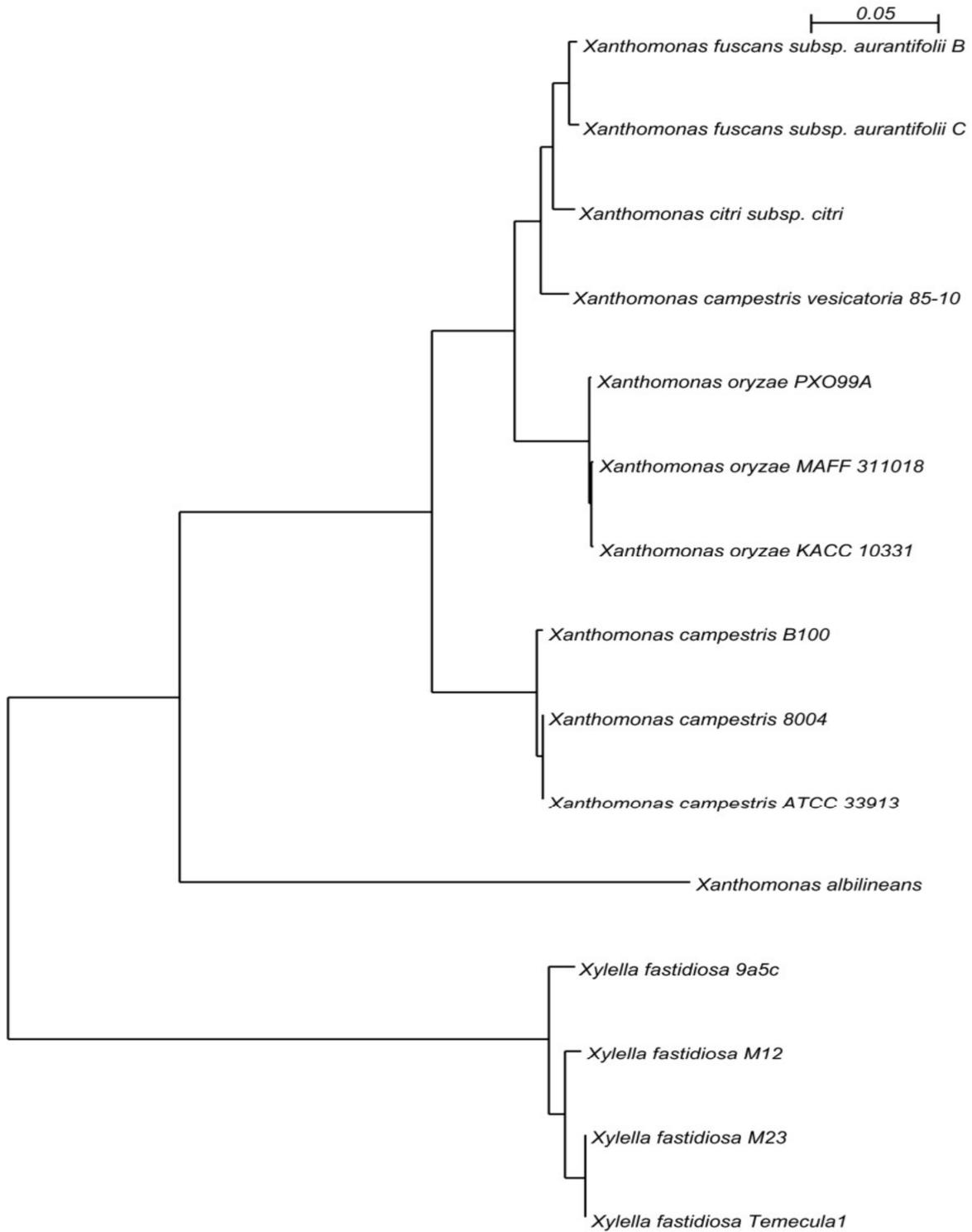
A tecnologia do DNA recombinante representa uma das alternativas ao combate de doenças vegetais. Considerando a atual situação do cancro cítrico, a transformação genética se torna uma ferramenta biotecnológica promissora, visto que a geração de plantas resistentes ao cancro amenizaria os gastos atribuídos às medidas preventivas onerosas, como a erradicação.

O estudo genético da interação do patógeno com a planta, na busca da compreensão dos mecanismos biológicos utilizados para a infecção do hospedeiro, pode trazer, adicionalmente, entendimentos relevantes sobre genética e bioquímica devido aos estudos das interações entre as proteínas estudadas e as vias bioquímicas que estão envolvidas neste processo.

1.2 Interação planta-patógeno na cancrose

A doença provavelmente é oriunda dos mesmos centros de origem dos citros, ou seja, sul da China, Indonésia e Índia, mas o cancro cítrico ocorre em quase todo o mundo, o que inclui a América do Sul, Estados Unidos, Japão, Nova Zelândia, África, entre outros. Embora não haja ainda consenso quanto à taxonomia da bactéria causadora do cancro cítrico, a classificação corrente tem considerado três “tipos” ou patovares diferentes de cancro: A, B e C (AMARAL, 2003). A bactéria que causa o cancro asiático (cancro tipo A) *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc ou *X. citri*) (SHAAD, 2006), também conhecida na nomenclatura mais antiga como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) é uma bactéria gram-negativa que pertence ao grupo asiático e afeta a maioria dos cultivares de citros, causando o principal e mais severo tipo de cancro (SILVA et al., 2002; BRUNINGS e GABRIEL, 2003; BARBOSA-MENDES, 2009). O cancro tipo B, cancrose B ou “falso cancro”, tem como principal hospedeiro o limão Galego, podendo ocorrer em laranja azeda, entre outros, e é restrito à Argentina, ao Paraguai e ao Uruguai e é causado pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, estirpe ou cepa B (*Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* B, nomenclatura antiga). O cancro tipo C, cancrose C ou “cancro do limão Galego”, infecta somente o limoeiro Galego e está restrito ao Brasil e é causado pela bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, estirpe ou cepa C (*Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* C, nomenclatura mais antiga) (AMARAL, 2003).

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) causa doença em pimentões/tomates suscetíveis, ou induz resposta de defesa no caso de cultivares resistentes e não hospedeiros e *X. citri* possui um alto grau de identidade com Xcv (figura 2).



Moreira *et al.* *BMC Genomics* 2010, 11:238.

Figura 2: Cladograma de máxima semelhança de genomas completamente sequenciados *Xanthomonas* ssp e *Xylella* ssp. Feito através do suporte “bootstrap” mostrando a proximidade genética de linhagens de *Xanthomonas* ssp. No cladograma são apresentadas *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) como *Xanthomonas campestris vesicatoria*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* B e *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* C com alto grau de identidade.

O mecanismo molecular pelo qual *X. citri* causa o cancro não é inteiramente conhecido, entretanto, sabe-se que a bactéria utiliza o sistema secretório tipo III para translocar um coquetel de proteínas efetoras que suprimem respostas de defesa e induzem hiperplasia e hipertrofia necessárias para o desenvolvimento da doença (BRUNNINGS e GABRIEL, 2003; FUJIKAWA, 2006).

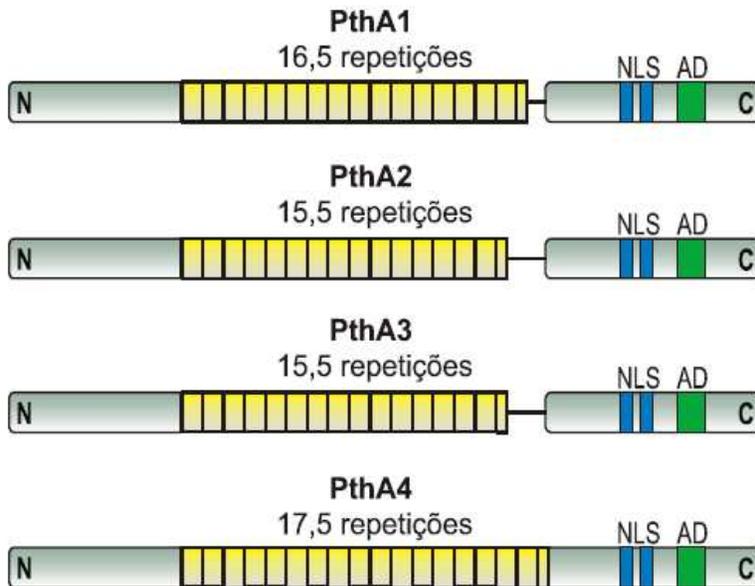
Dentre as proteínas efetoras de *Xanthomonas* spp. mais estudadas destacam-se os membros da família AvrBs3/PthA, que são fatores de transcrição, recentemente chamados de efetores ativadores de transcrição (“*transcription activator-like*” ou TAL) (BOCH, 2009). Estruturalmente, as características essenciais para a atividade dos efetores TAL são: um domínio central composto por 34 resíduos de aminoácidos que se repetem *in tandem* em número variável; domínios de localização nuclear (“*nuclear localization signals*” ou NLS) e de ativação transcricional (“*acidic transcription activator-like domains*” ou AD) (SZUREK, 2001; FUJIKAWA, 2006; KAY e BONAS, 2009) (figura 3).



Pereira, 2011; Tese de doutorado.

Figura 3: Estrutura das proteínas da família AvrBs3/PthA. As principais diferenças estão no domínio interno, que pode conter de 5,5 a 28,5 repetições *in tandem* de 34 aminoácidos. Domínio interno em amarelo. Em azul estão os domínios de localização nuclear (NLS) e em verde está o domínio de ativação transcricional (AD). N: N-terminal e C: C-terminal.

A proteína PthA (pth “*peptidyl-tRNA hydrolase*” A “*Avirulence*”) é um membro da família de proteínas efetoras AvrBs3/PthA. Existem quatro isoformas de PthA em *X. citri* que diferem entre si principalmente pelo número de repetições do domínio central: pthA1 possui 16,5 repetições, pthA2 e pthA3 possuem 15,5 repetições e pthA4 possui 17,5 repetições (figura 4) (BRUNNINGS e GABRIEL, 2003; SILVA, 2002). As proteínas AvrBs3/PthA possuem uma estrutura de domínios semelhantes, composta por 3 regiões básicas: uma região N-terminal, um domínio central repetitivo e uma região C-terminal.



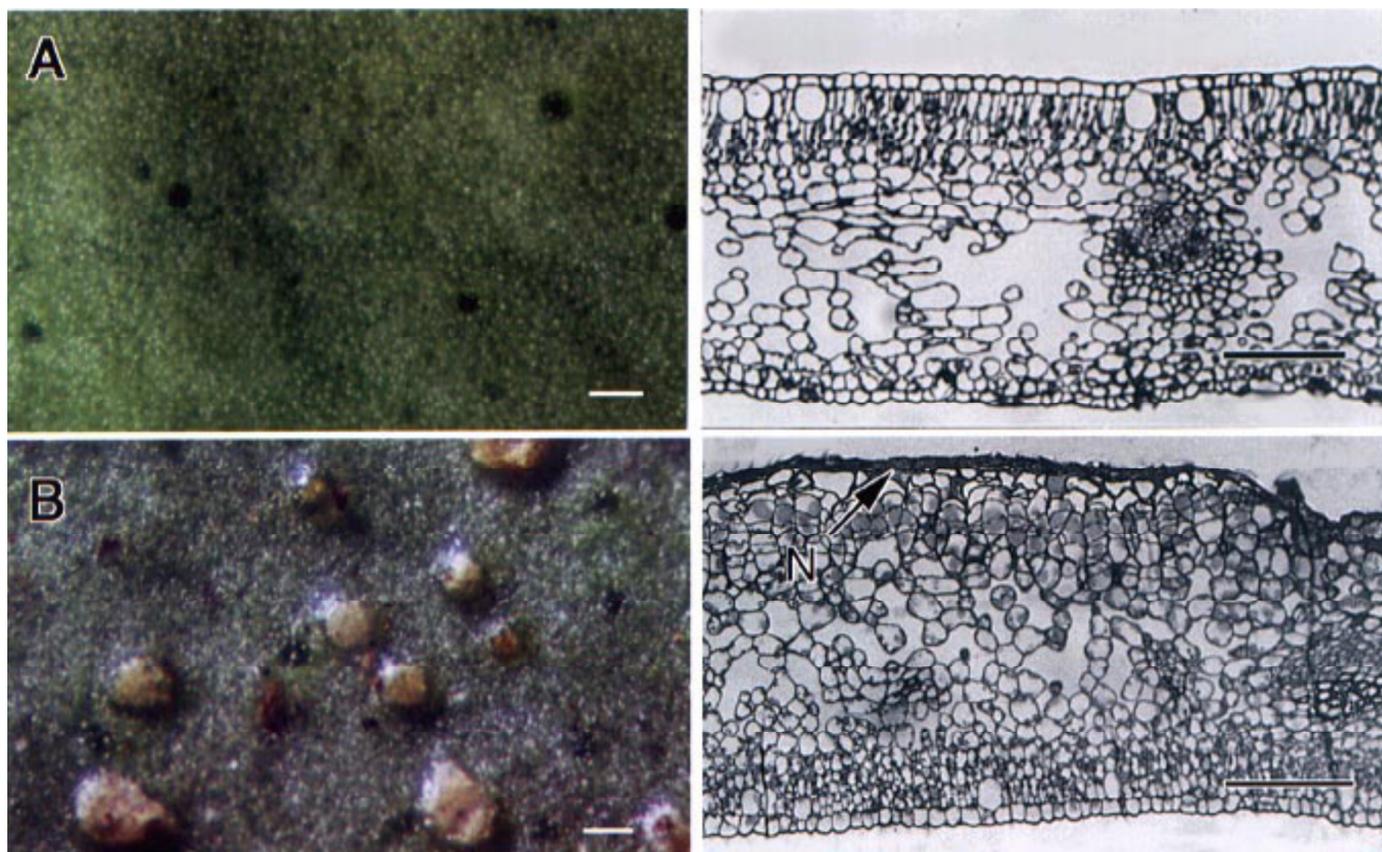
Pereira, 2011; Tese de doutorado.

Figura 4: Características estruturais de PthA de *X. citri*. As PthAs se diferem basicamente pelo número de repetições que são encontradas no domínio interno (amarelo). Em azul estão os domínios de localização nuclear e em verde está o domínio de ativação transcricional. N: N-terminal e C: C-terminal, NLS: domínios de localização nuclear, AD: domínio ácido de ativação transcricional.

Em princípio as proteínas efetoras funcionam como fatores de virulência, porém quando são reconhecidas ou tem seus efeitos detectados pelo hospedeiro, atuam como fatores de avirulência induzindo resposta HR (“*hypersensitive response*” ou resposta de hipersensibilidade). Por esta razão, originalmente as proteínas efetoras foram definidas como proteínas de avirulência (BRUNINGS e GABRIEL, 2003).

Um dos sistemas mais complexos de secreção é o sistema secretório tipo III, formado por mais de 20 proteínas envolvidas em um complexo em formato de agulha, que evoluiu provavelmente de estruturas flagelares. Esse complexo é responsável pela translocação de proteínas efetoras (MCCANN, 2008). A proteína efetora AvrBs3 interage por meio do NLS com alfa-importinas de pimentão, sendo direcionada para o núcleo onde interage diretamente com promotores de genes-alvo, ativando genes envolvidos com o desenvolvimento de hiperplasia celular no caso de plantas susceptíveis (Kay e, 2007; SZUREK, 2001). Foi demonstrado que todas as variantes de PthA interagem com uma alfa-importina de *C. sinensis* pelas sequências NLS (DOMINGUES, 2010).

A proteína efetora PthA, membro da família AvrBs3/PthA, foi uma das primeiras proteínas Avr ("avirulence") de *X. citri* para a qual se demonstrou uma função no desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico. Sua expressão transitória em citros é suficiente para causar hiperplasia e hipertrofia tecidual (figura 5). A proteína PthA é portanto, o principal fator de patogenicidade de *X. citri* descrito até o momento (DUAN, 1999; BRUNNINGS e GABRIEL, 2003; KAY e BONAS, 2009).



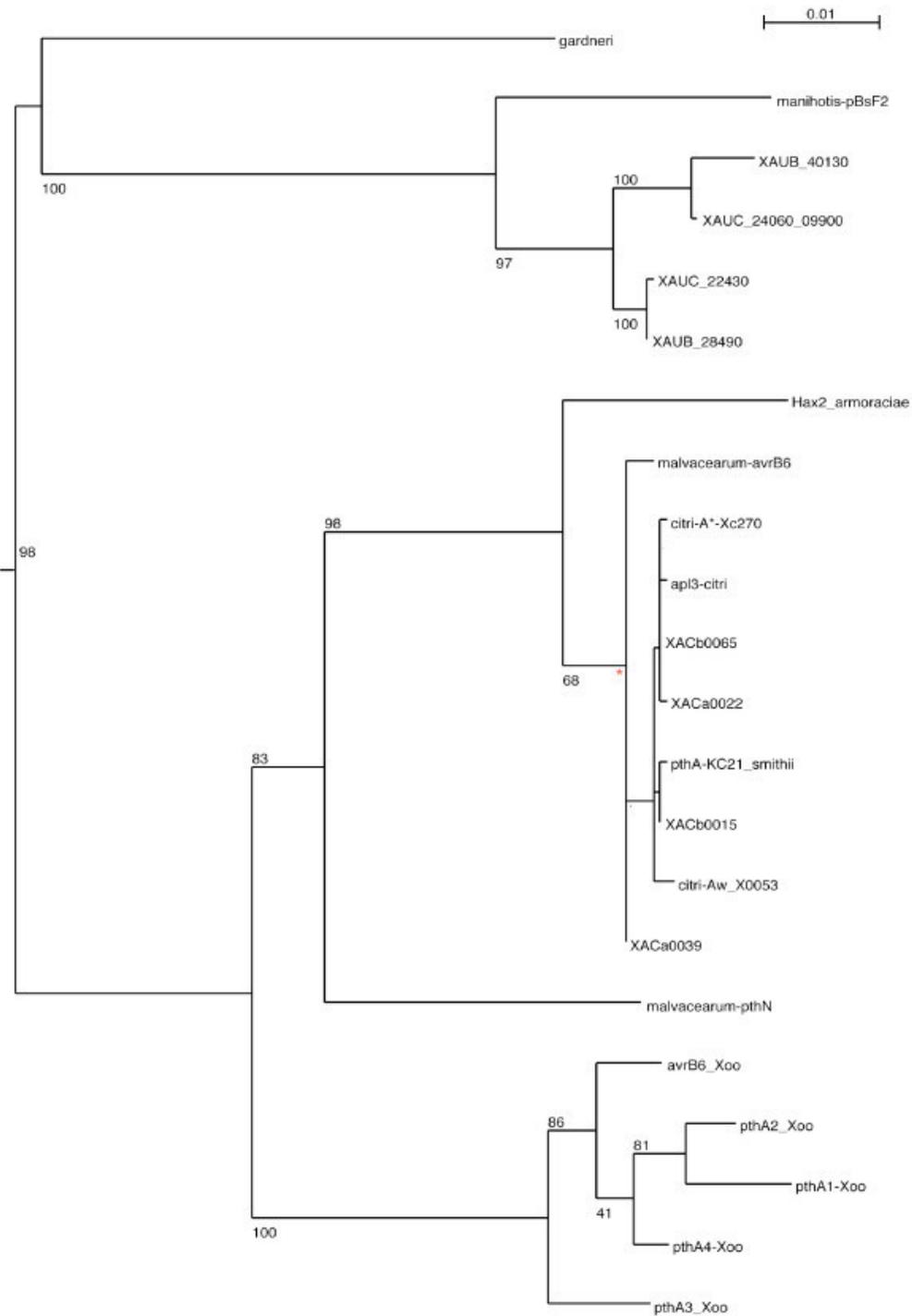
Duan et al. *Mol. (1999). Plant-Microbe Interact.* 12: 556–560.

Figura 5: Fenótipo provocado em *Citrus sinensis* por PthA em transformação transiente nas folhas. Coluna da esquerda: vista da superfície das folhas com ampliação de baixo nível. Coluna da direita: seções finas do tecido foliar. A: Controle. Aparência de tecido foliar após três semanas do bombardeio biobalística com pBI221. B: Efeito da proteína PthA três semanas após o bombardeamento com pYD12.5. São mostrados o aumento do número de células (hiperplasia), a perda do espaço extracelular livre (apoplasto) no parênquima esponjoso (hipertrofia).

A proteína efetora AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) é um importante fator de virulência de Xcv, necessário para causar doença em pimentões/tomates suscetíveis, ou induzir resposta de defesa no caso de cultivares resistentes e não hospedeiros. Em nível molecular, a função do AvrBs3 consiste na

ativação de genes do hospedeiro associados aos sintomas da doença, atuando portanto como um fator de transcrição. A AvrBs3 transativa especifica e diretamente o gene *upa20*, regulador majoritário do processo de hipertrofia nas células do mesófilo de pimentão. Este gene codifica um fator de transcrição com domínio "*basic helix loop helix*" que é o regulador majoritário do processo de hipertrofia celular. Além disso, foi identificado o "box" de ligação de AvrBs3, um TATA-box denominado UPA-"box" ("*up-regulated*" por AvrBs3) (TATATAAACCN2-43CC), uma região conservada do DNA encontrada nos genes "*up-regulados*" por AvrBs3 (YANG, 2000; KAY, 2007; RÖMER, 2007; KAY, 2009).

A família de proteínas efetoras PthA/AvrBs3 tem um alto grau de identidade entre si (figura 6). Sendo que as proteínas PthA variantes 1, 2, 3 e 4 são chamadas de: XACa0022 (pthA1), XACa0039 (pthA2), XACb0015 (pthA3) e XACb0065 (pthA4) ("*THE Xanthomonas RESOURCE*", 2013; MOREIRA, 2010).



Moreira *et al. BMC Genomics* 2010, **11**:238.

Figura 6: Cladograma de proteínas efetoras de *Xanthomonas* ssp. A posição da raiz foi obtida a partir de uma árvore preliminar de gene pth disponível em [GenBank: CAD15517.1]. Os genes das variantes da proteína PthA: XACa0022 (pthA1), XACa0039 (pthA2), XACb0015 (pthA3) e XACb0065 (pthA4) demonstram alto grau de identidade entre as variantes de pthA.

Ainda não é bem compreendida a razão pela qual, evolutivamente, *X. citri* conservou quatro variantes de PthA, sobretudo o papel de cada variante no desenvolvimento do cancro cítrico. Recentemente, através de ensaios de duplo-híbrido, foram detectadas várias interações proteína-proteína, envolvendo as diferentes variantes de PthA e proteínas de citros. Em síntese, os “*screenings*” ou triagens foram realizados usando-se uma biblioteca de cDNA de folhas de laranja para identificar parceiros de interações das variantes 2, 3 e 4 de PthA. A maioria das proteínas de citro isoladas está associada ao controle da transcrição, reparo de DNA e estabilização de mRNA (DOMINGUES, 2010). Uma α -importina semelhante àquela que interage com AvrBs3 (SZUREK, 2001) também foi detectada. Além disso, verificou-se a formação de homo e heterodímeros de PthA, levantando-se a hipótese de que a dimerização contribui para alternar a interação dos PthA com alvos distintos no hospedeiro. Neste modelo, o parceiro de interação do heterodímero PthA1/2 é diferente do parceiro de PthA1/3, que é por sua vez diferente dos parceiros dos homodímeros de PthA1, 2 e 3. (DOMINGUES, 2010). Outra razão possível para a conservação desse repertório de proteínas PthA é que, através da formação de heterodímeros, PthAs interagem de forma diferente no hospedeiro, o que pode conferir maior dificuldade para resposta de defesa à doença pelo hospedeiro permitindo o desenvolvimento de cancro cítrico (CERNADAS, 2008).

As bactérias Gram-negativas translocam, através do sistema de secreção do tipo III (T3SS), um coquetel de proteínas, inclusive as proteínas efetoras TAL (“*transcription activator-like*”), que são capazes de ativar a transcrição no hospedeiro (plantas), pois se ligam a promotores, e induzem a expressão de genes da planta (MARLOVITS, 2010). As proteínas TAL possuem a capacidade de se ligarem ao DNA com uma especificidade previsível (BOCH, 2009). Esta especificidade tornou aplicável o uso de proteínas TAL como ferramentas biotecnológicas: ativadores de genes específicos, repressores, sondas de DNA para substituição de genes e de mutações, sendo assim uma esperança para futuros tratamentos terapêuticos (SCHOLZE e BOCH, 2011). A tecnologia dos efetores TAL já vem sendo utilizada com sucesso (HUANG, 2011).

Outros genes como xopE3 e xopAI são apontados como possíveis fatores de virulência de *X. citri* (MOREIRA, 2010). Além disso, XacPNP uma proteína que modula a homeostase do hospedeiro em benefício do patógeno, foi caracterizada como importante fator de patogenicidade (GOTTIG, 2009a; GARAVAGLIA, 2010).

Finalmente, a proteína XacFhaB foi identificada como um novo fator de patogenicidade associado ao desenvolvimento do cancro cítrico. Mutantes de *X. citri* deficientes na produção de XacFhaB mostraram incapacidade de aderir à superfície foliar, indicando uma função importante na fase inicial da patogênese, quando a bactéria se adere à superfície das folhas e também na sobrevivência da bactéria dentro do tecido foliar (GOTTIG, 2009b; TONDO, 2010; MARTINS, 2010).

1.3 Sistema de defesa vegetal

As plantas possuem dois tipos de imunidade, a imunidade inespecífica e a imunidade específica. A imunidade não específica é conhecida como PTI (“*PAMP-triggered immunity*”) (JONES, 2006) esta imunidade é baseada no reconhecimento de PAMPs e flagelinas (GÓMEZ-GÓMEZ, 2002) e lida com agentes agressores, sejam eles bióticos ou abióticos.

A imunidade específica em plantas é conhecida como ETI (“*effector-triggered immunity*”) e é mediada pelos genes de resistência (R). A maioria dos genes R codifica proteínas NB-LRR (“*nucleotide-binding leucine rich repeats*”) que reconhecem alvos diretos específicos do patógeno, como é o caso das proteínas efectoras (JONES, 2006). Devido a essa habilidade de serem reconhecidas por não hospedeiros essas proteínas podem ser chamadas de proteínas Avr (TAMPAKAKI, 2004). A resposta ETI ocasiona uma reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada por intensa morte celular local das células vegetais, freando o crescimento do patógeno (JONES, 2006).

1.4 A auxina é necessária para o desenvolvimento do cancro

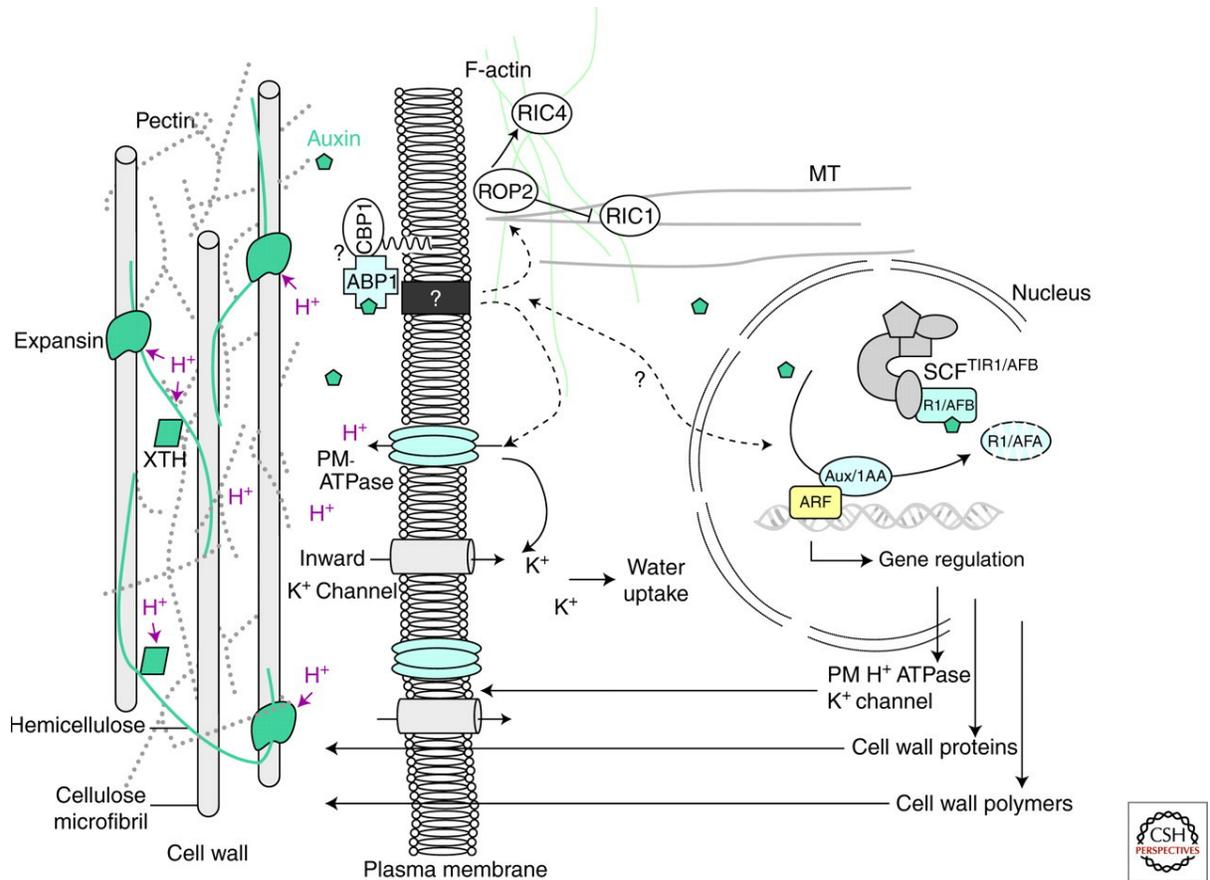
É sabido de acordo com a “Teoria do Crescimento Ácido”, que a auxina é fundamental para o crescimento celular, pois é responsável pelo alongamento celular por promover um aumento no fluxo de H⁺ tornando o pH (potencial hidrogeniônico) mais ácido no apoplasto (compartimentos existentes exteriormente à membrana plasmática). Tal reação leva a ativação de expansinas, um grupo de proteínas que atuam quebrando as pontes de hidrogênio das ligações cruzadas entre as microfibrilas de celulose e as hemiceluloses. Após, outras enzimas são ativadas (hidrolases, pectinases, celulasas e hemicelulasas) que atuam sobre os componentes da parede celular, provocando seu afrouxamento e aumentando sua extensibilidade. Quando a parede da célula é parcialmente degradada pela ação de auxinas, esta parede se torna menos rígida sendo expandida pela pressão proveniente do interior da célula, principalmente por vacúolos em

crescimento (TAIZ, 2012. PLANT PHYSIOLOGY 2006 (capítulo 19), online). Este não é o único mecanismo de crescimento celular, além de auxina e citocinina que já são conhecidas por serem hormônios vegetais importantes envolvidos na regulação do crescimento de gemas axilares em ramos, outro hormônio envolvido no processo de crescimento foi mostrado recentemente por um trabalho desenvolvido por Beveridge em 2009. Através da utilização de mutantes de ramificação em ervilhas Beveridge mostrou que os hormônios strigolactones também estão associados a este processo.

As expansinas são de uma família de múltiplas proteínas capazes de produzir o afrouxamento da parede celular de células de plantas, além disso, são conhecidas por funcionar no crescimento de planta regulado por auxina (HAGER, 2003; LI, 2003).

As proteínas "*Auxin/indole-3-acetic acid*" (*Aux/IAA*) são os fatores de transcrição que atuam como repressores na regulação por auxina. A família de proteínas *Aux/IAA* consiste de, pelo menos, trinta e um membros (JAIN, 2006). A expressão de genes *Aux/IAA* é regulada por ARF (fatores responsivos à auxina) que pode ativar ou reprimir o gene alvo de expressão.

A figura 7 apresenta um esquema de crescimento celular vegetal promovido pelo hormônio auxina e sua correlação com as proteínas ARF, *Aux/IAA* e expansina na promoção da expansão celular.



Perrot-Rechenmann, C. Cold Spring Harb Perspect Biol 2010; 2:a001446.

Figura 7: A auxina induz, por afrouxamento da parede celular, a expansão celular. O esquema representa a parede celular, a membrana plasmática e citoesqueleto em um sistema contínuo e as consequências da ação de auxina. Auxina é reconhecida pelo receptor “*auxin-binding protein 1*” ABP1, que interage com proteínas desconhecidas associadas à membrana plasmática. Isto ativa o bombeamento de prótons de ATPase, o que provoca a acidificação por produção de H⁺ no espaço extracelular. Além disso, há a participação de proteínas da parede celular, tais como expansina e xiloglucano endotransglicosilase hidrolases (XTH), que medeiam afrouxamento da parede celular, agindo na rede polissacarídica da parede celular. A auxina aumenta esses efeitos induzindo promotores de genes que codificam ATPase, canais de exportação de potássio e expansina. No esquema à direita (desenho do núcleo com a fita dupla-hélice de DNA): representação de auxina agindo no promotor de genes associados ao crescimento (ATPase, canais de exportação de potássio e **expansina**). Na região promotora um ARF está ligado ao DNA (neste caso agindo como repressor) a proteína Aux/IAA esta ligada ao ARF promovendo a repressão do gene. A auxina promove a degradação de Aux/IAA (KEPINKI e LEYSER, 2004) desta forma não há mais repressão do gene e a transcrição do gene é promovida.

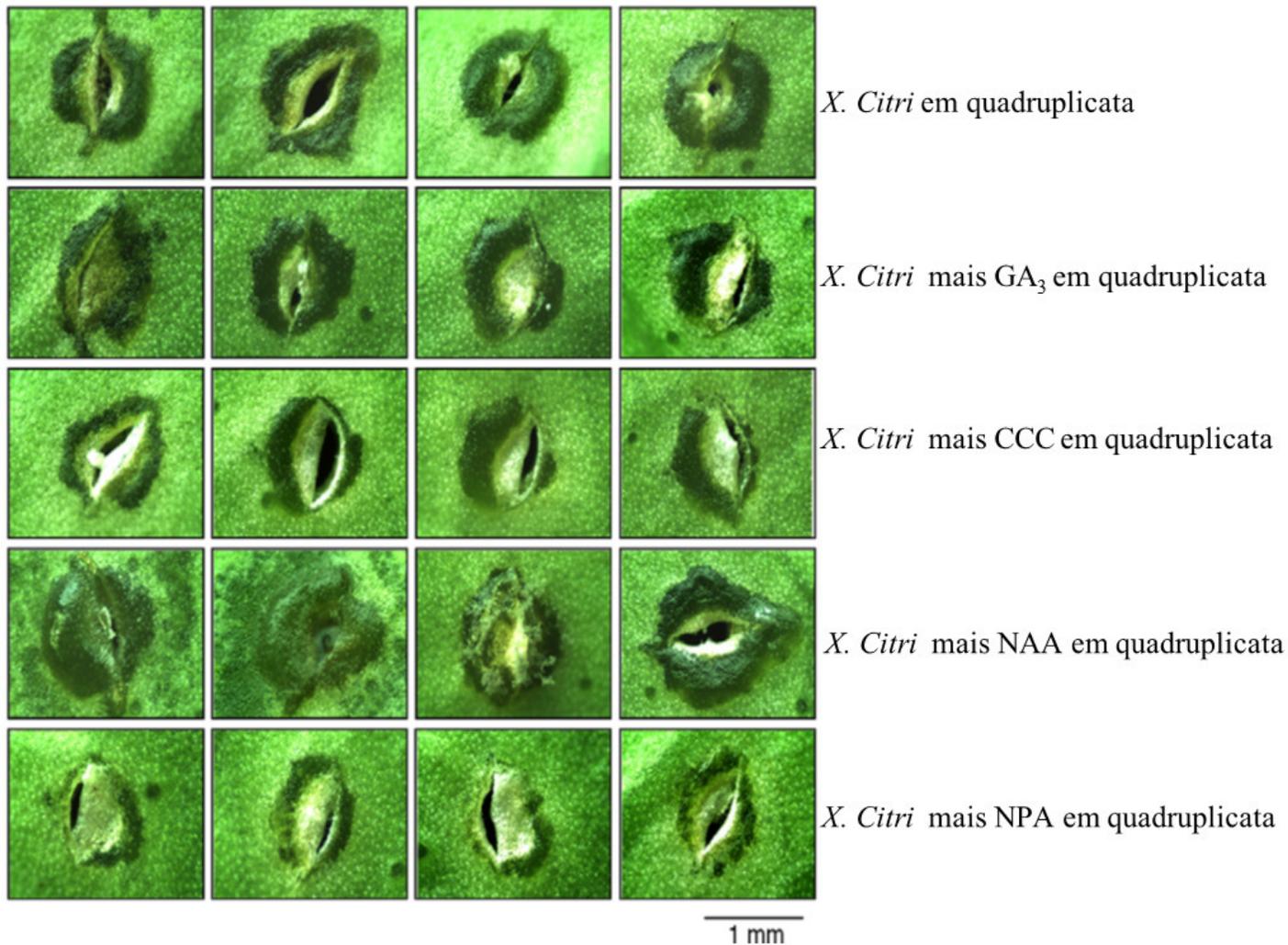
A expressão de expansinas promove uma vulnerabilidade das plantas aos patógenos, pois o afrouxamento das paredes das células torna as células vegetais vulneráveis aos patógenos invasores (DING, 2008).

Sabendo que a auxina regula o promotor de expansinas e promove o alongamento celular, Cernadas (2008) demonstrou que um promotor do gene expansina (*CsEXP*) foi ativado por *X. citri* e auxina, sendo considerado então um importante alvo de estudo no processo da infecção e desenvolvimento do cancro cítrico.

1.5 A instauração da doença está ligada a ativação de hormônios no hospedeiro

Em um trabalho realizado por Cernadas (2008) foi avaliado o perfil de expressão gênica diferencial exibida em folhas de laranja infiltradas com *X. citri* ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (sinônimo na nomenclatura mais recente é *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*) cuja cepa C é endêmica à região sul do Brasil e é capaz de causar cancro cítrico somente em limão Galego e que, em laranja doce, induz uma resposta de defesa HR, sendo assim, *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* não é capaz de causar a doença em outros citros mas pode estar caminhando evolutivamente para ser capaz de causar a doença. A análise do perfil transcricional entre *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* e *X. citri* revelaram genes ligados com a ativação dos sintomas da doença e/ou com a defesa, tendo em destaque genes de remodelamento da parede celular, divisão e expansão celular, síntese e mobilização de auxina e giberelina, biogênese de ribossomo, genes de defesa antioxidante, entre outros.

Em outro trabalho desenvolvido por Cernadas (2009) foi mostrado que o hormônio auxina potencializou a divisão e a expansão celular promovida pela infiltração de *X. citri* em folhas de citros e além disso na presença de inibidores dos hormônio auxina e giberilina o cancro foi suprimido (figura 8). Este trabalho também mostrou que *X. citri* e PthA promovem a ativação de genes envolvidos em divisão e expansão celular e genes de mobilização de auxina. Outros trabalhos também corroboram a este fato (DING, 2008; DOMINGO, 2009; NAVARRO, 2006; WANG, 2005).



R.A. Cernadas, Plant Science 177 (2009) 190–195.

Figura 8: Folhas de laranja doce infectadas por inoculação com *X. citri* por picada de agulha foram excisadas das plantas e colocadas com soluções aquosas de ANA (ácido naftaleno-acético), GA₃ (ácido giberélico), CCC (cloreto de clorocolina) e NPA (ácido naftil-p-talâmico) (10 mM cada), ou com água (controle). Quatro imagens representativas de lesões individuais de cada tratamento são mostradas na horizontal. Folhas infiltradas com *X. citri* na presença de auxina e giberilina com um aumento significativo na formação de pústulas em relação ao controle (somente *X. citri*), e que na presença de um inibidor de auxina, o NPA, e de giberilina CCC, não houve formação de pústulas (efeito mais evidente com NPA), mostrando portanto, que a auxina e giberilina são necessárias ao desenvolvimento da doença.

O trabalho mostrou que *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* C) induz a expressão de vários genes envolvidos na defesa e que estão relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio e reforço da parede celular. Demonstrou também que a via de sinalização responsável pela resposta de defesa

basal causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* C em laranja envolve proteínas MAPK (quinase ativada por mitógenos) e fatores de transcrição WRKY caracterizadas por um domínio conservado na sequência proteica do tipo WRKYGQK (EULGEM, 1999). Em contrapartida, *X. citri* é capaz de suprimir a defesa do hospedeiro e induzir a expressão de uma série de genes associados ao desenvolvimento dos sintomas do cancro, como aqueles envolvidos em remodelamento da parede celular, divisão e expansão celular, síntese e mobilização de auxina e giberelina, e biogênese de ribossomo, entre outros (CERNADAS, 2008).

O trabalho desenvolvido por Cernadas (2009) mostrou que a ativação de auxina e giberelina promovida por *X. citri* são os pontos chave para o desenvolvimento dos sintomas da doença. A giberelina está envolvida em associação com auxina. Esta se mostrou necessária ao desenvolvimento dos sintomas do cancro. Estes hormônios agem no controle do crescimento e divisão celular através da expressão dirigida de enzimas hidrolíticas da parede celular. Desta forma, o balanço hormonal auxina/giberelina está relacionado aos principais sintomas observados durante a cancriose. De fato, na presença de um inibidor de auxina a formação de pústulas foi reduzida durante a infecção por *X. citri*. Paralelamente, um inibidor da síntese de giberelina inibiu significativamente transcritos induzidos por auxina, bem como o aparecimento de lesões típicas de cancro (CERNADAS, 2009). Esses resultados sugerem, portanto, que existe um “*cross-talking*” ou uma ligação entre auxina e giberelina necessário para o controle da transcrição de genes da laranja envolvidos na divisão e expansão celulares desencadeados por *X. citri* (CERNADAS, 2009). A análise do perfil de expressão gênica de citros dependente de PthA a partir de epicótilos de citros com expressão transiente de PthA4 apontou que há um aumento na transcrição de um número de genes associados ao metabolismo de auxina (PEREIRA, 2011).

1.6 A proteína “Auxin Response Factor” (ARF)

A família de proteínas ARF (“*auxin response factor*”) funciona como reguladora da via de sinalização da auxina, atuando tanto como ativadora quanto bloqueadora desta via em plantas. A via de sinalização da auxina é fundamental para o crescimento, desenvolvimento, processos de embriogênese e senescência das plantas, pois esses processos são iniciados e/ou mediados por expressão gênica regulada por auxina (ELLIS, 2005). Os ARFs formam, em *Arabidopsis thaliana*, uma família de fatores de transcrição

com 23 proteínas, sendo que todas possuem uma estrutura em comum de domínios conservados (figura 9). Como todos os fatores de transcrição, estes têm domínios envolvidos na ligação ao DNA e ativação ou repressão da transcrição (GUILFOYLE e HAGEN, 2007). Essas proteínas podem ser divididas em repressores ou ativadores de transcrição gênica dependendo de sua capacidade de transativar genes repórteres sintéticos, como o DR5(7X)-GUS (TIWARI, 2003).

Foi observado também em *A. thaliana* que ARFs ricos em resíduos de prolina (P), serina (S) e treonina (T) em sua região central são normalmente repressores da transcrição gênica, enquanto que os ricos em glutamina (Q) são ativadores da transcrição.



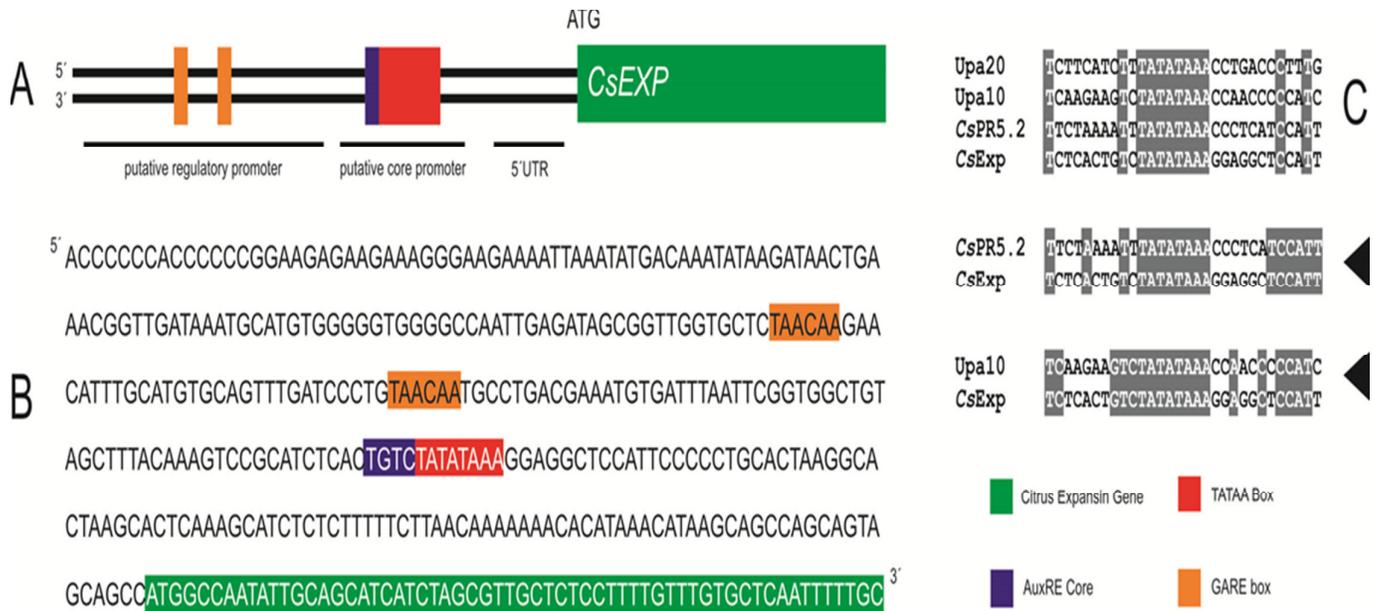
Souza, 2010; Dissertação de Mestrado.

Figura 9: Estrutura de domínios de proteínas do grupo das ARFs. A região N-terminal é formada pelo domínio de ligação ao DNA B3 e o domínio AuxR. Uma longa região predita como desestruturada liga o N-terminal ao domínio de dimerização proteína-proteína Aux/IAA CTD (domínio C-terminal).

A região N-terminal da proteína ARF se liga a uma região do DNA conhecida como domínio B3. As proteínas ARFs ligam-se a elementos que respondem à auxina (AuxREs) na região promotora desses genes. A composição de aminoácidos da região central de uma proteína ARF pode estar envolvida na determinação de sua função como um ativador ou repressor da transcrição (OKUSHIMA, 2005). Os ARFs podem interagir com proteínas Aux/IAA e entre si (LI, 2004). Acredita-se que essa multiplicidade de possibilidades de interações esteja diretamente envolvida na fina regulação hormonal por auxina durante todo o desenvolvimento da planta (WEIJERS, 2005). Além disso, outras proteínas podem estar envolvidas com essa regulação estabelecendo complexos estáveis no DNA, através da interação proteína-proteína com ARFs. Isso aumenta muito a possibilidade de parceiros e a complexidade da regulação gênica (SHIN, 2007).

Foi demonstrado que os ARFs são capazes de ligar especificamente uma região consenso, que foi chamada de AuxRE “box” e que consiste na sequência TGTCTC (ou GAGACA) (ULMASOV, 1995). Foi descrita também uma interação *in vivo* de um ARF (MONOPTEROS) com seu alvo no promotor do gene Dornröschen no desenvolvimento do

cotilédone de *A. thaliana* (COLE, 2009). Dentre as várias proteínas de citros que interagem com PthA, a proteína CsARF (ARF de citros) foi identificada e caracterizada pelo sistema de duplo híbrido (Souza, 2010). Dada a similaridade de sequência de aminoácidos observada entre a proteína CsARF e a AtARF2, um repressor transcricional da via de sinalização das auxinas em *A. thaliana* (ULMASOV, 1999; LIM, 2010), considerou-se a hipótese de que CsARF também funcione como um repressor da via de sinalização da auxina. Além disso, a região central de CsARF é rica em resíduos de serina e prolina, indicando que esta proteína pode estar atuando como repressora. Estudar a função da proteína CsARF de citros como repressor ou ativador transcricional através de análises de expressão gênica em resposta à auxina assim como identificar regiões promotoras de citros que pudessem ser alvos simultâneos de PthAs e CsARF é fundamental para entender o desenvolvimento do cancro cítrico e desenvolvimento de plantas através do uso de ferramentas biotecnológicas. Um dos genes alvos selecionados codifica para a proteína expansina, CsEXP (CERNADAS, 2008; CERNADAS, 2009). Analisando-se a região 5' a montante do gene CsEXP, identificou-se uma sequência TGTCTA que está justaposta ao possível TATA-“box” do promotor do gene. Essa mesma região é muito similar às regiões de ligação de AvrBs3 (“upa-boxes”) em genes regulados por essa proteína, como “upa20” e principalmente “upa10” (figura 10). Além disso, a região do provável TATA-“box” é muito similar à uma outra região promotora isolada do gene PR5.1 de citros, também “up regulado” por *X. citri* (CERNADAS, 2008), e que é alvo de ligação de PthAs (PEREIRA, 2011).



Souza, 2010; Dissertação de Mestrado.

Figura 10: Análise da sequência 5'UTR do gene da expansina de citros (*CsEXP*). (A) Representação esquemática da estrutura do gene *CsEXP* com a região 5'UTR isolada. Um provável TATA-box está situado à -100 pb do ATG inicial e um core AuxRE (TGTCTA) flanqueia o provável TATA-box identificado pelo programa *PlantCare*. Dois elementos GARE (“*gibberellic acid responsive element*”), TAACAA, estão à -170 e -205 pb do mesmo ATG. (B) Sequência 5' UTR do gene com os elementos em cores. (C) Alinhamento das prováveis regiões promotoras em torno do TATA-box dos genes *upa20* e *upa10* de pimentão, *PR5.2* e *CsEXP*. As setas escuras indicam os alinhamentos mais relevantes: entre *CsEXP* e *CsPR5.2* e entre *CsEXP* e *Upa10*.

Outra possível região de interação para proteína PthA aparece na mesma região clonada como possível região promotora *CsEXP* mínima. O “*box*” predito para PthA2 tem a sequência ACACACCTCTTTTAAT de acordo com o trabalho de Boch em 2009. O promotor mínimo do gene utilizado nos testes de atividade da β -glucuronidase possui uma sequência similar ACACATAAACATAAGC que apesar dos “*mismatches*” ou trocas o sítio de ligação corresponde a sequências equivalentes e pode ser uma região de co-interação entre a proteína PthA e a proteína *CsARF*.

2 Justificativas

Sabendo-se que a proteína CsARF de citros é semelhante ao repressor transcricional de resposta à auxina de *A. thaliana* AtARF2 e que PthAs interagem com a proteína CsARF, além de que auxina e giberelina controlam a expressão do gene CsEXP de citros e este gene CsEXP contém prováveis elementos cis-regulatórios de resposta à auxina e giberelina e contém um provável sítio de ligação de PthA (TATA-box) e um provável “box” AuxRE (TGTCTA) para ligação de CsARF, pretendeu-se estudar o papel da proteína CsARF como repressor da transcrição em citros em resposta à auxina e demonstrar que a região 5’ a montante do gene CsEXP funciona como promotor mínimo *in vivo* que responde à auxina. O promotor mínimo é uma região menor excisada da região promotora inteira e testada para se saber se esta região mínima ainda possui atividade como promotora.

A proteína efetora PthA é responsável por causar os sintomas do cancro cítrico ao entrar na célula onde atua como parceira de interação com proteínas do hospedeiro para controlar as transcrições celulares. A CsARF foi encontrada em um duplo híbrido como parceira de interação da proteína PthA, e é um fator responsivo a auxina. Como CsARF é muito similar a AtARF2, uma ARF de *Arabidopsis thaliana* que atua como um repressor na via de auxina, propomos que CsARF também atue como um repressor da via de auxina. Ao interagir com CsARF a proteína PthA faz com que CsARF deixe de reprimir a via de auxina, desta forma PthA ativa a sintetização de auxina que é um hormônio necessário para o desenvolvimento da doença.

3 Objetivos:

3.1 Geral

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a regulação do provável promotor mínimo do gene CsEXP em relação à via de sinalização da auxina e à proteína PthA e estudar a função da proteína CsARF como repressor transcricional.

3.2 Específico

- Caracterizar e analisar o provável promotor mínimo de expansina de citros (CsEXP) regulado por auxina e *X. citri* através de análises do gene repórter GUS, em ensaios de expressão transitória em epicótilos de laranja doce ou tabaco.

- Analisar se as possíveis regiões de sítio de ligação para as proteínas CsARF e PthA se ligavam a essas proteínas através de experimento de “gel shift”.
- Super-expressar o gene CsARF em laranja doce e avaliar a transcrição de genes em resposta à auxina através de microarranjos de DNA, usando-se a plataforma *Affymetrix*.

4 Procedimento Experimental

4.1 Clonagens de *Csarf* e da região mínima do promotor *Csexp* de citros

A região correspondente a *Csarf* foi sacada com as enzimas de restrição *SacII* e *NotI*, da construção pGEM (T-Easy)-CsARF já existente no laboratório (SOUZA, 2010). Em seguida *Csarf* foi transferida para pGreenII, sendo portanto criada a construção pGreen-CsARF, com a finalidade de transformar plantas para super-expressão de CsARF. Tal construção foi enviada para o sequenciamento de DNA, o qual confirmou a clonagem.

A região mínima do promotor de expansina CsEXP foi retirada da construção existente previamente CsEXP-pGEM, com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NcoI* e posteriormente transferida para o vetor pCam3301, com o intuito de uso no experimento de ativação do gene repórter afim de testar o promotor mínimo CsEXP em questão. Foi, portanto realizada a construção CsEXP-pCAM com a região mínima do promotor de expansina CsEXP dirigindo a expressão do gene da β -glucuronidase (GUS). A construção foi enviada ao sequenciamento, que confirmou a clonagem.

O vetor de expressão em *Agrobacterium tumefaciens*, pGreen, age acompanhado do vector pSoup em parceria de interação para a transformação do tecido vegetal, para a super-expressão de CsARF. A figura 11 apresenta o mapa do vetor pGreenII utilizado nas clonagens em questão:

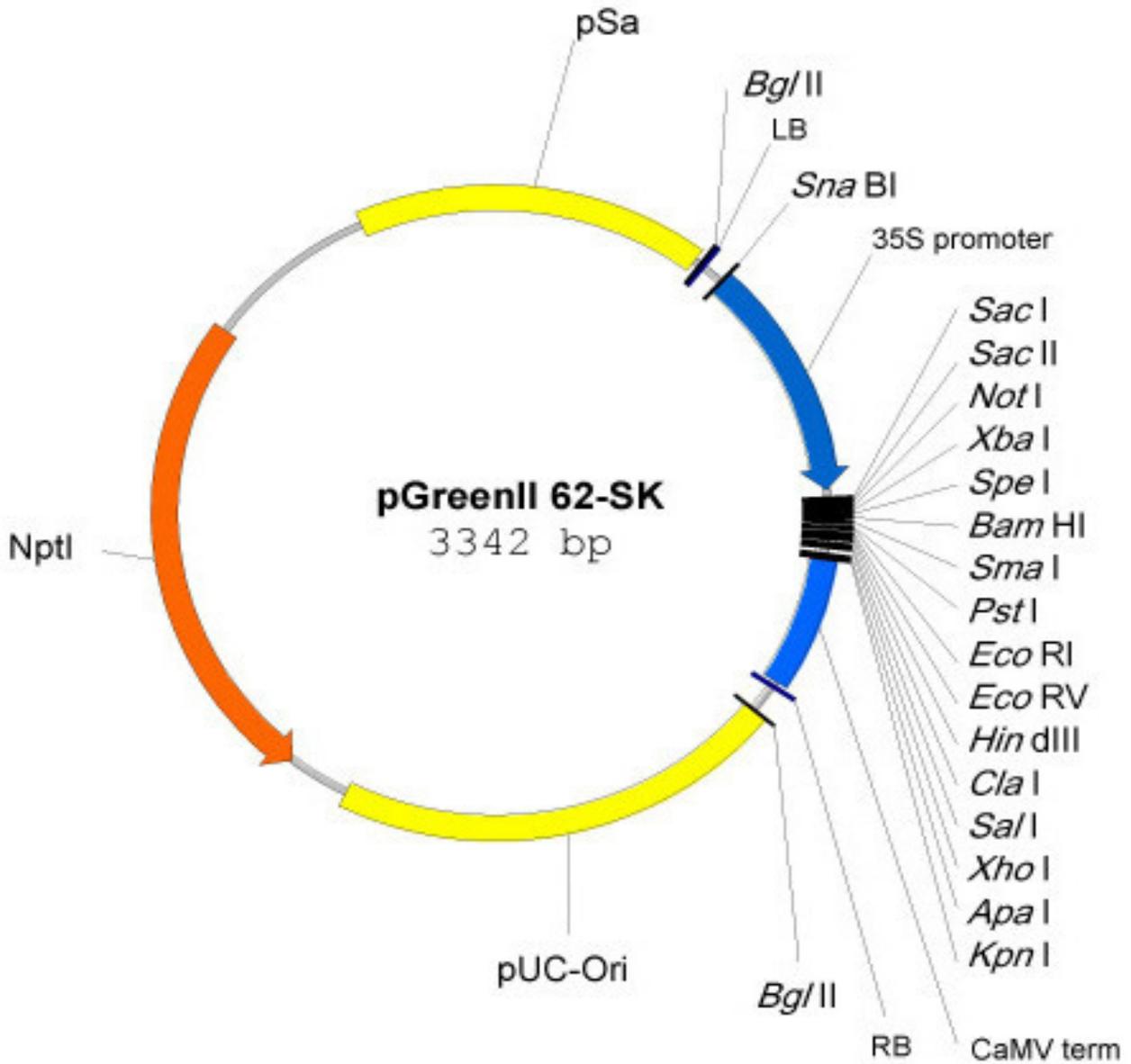


Figura 11: Mapa do vetor pGreenII usado nos experimentos de clonagem. Indicando sítios enzimáticos e resistência ao antibiótico kanamicina para seleção nas clonagens. Possui um tamanho de 3342 pb.

O outro vetor para expressão em *Agrobacterium tumefaciens*, o pCambia3301, foi utilizado para transformação de tecido vegetal afim de realizar o ensaio de atividade da β -glucuronidase. A figura 12 apresenta o mapa do vetor pCambia utilizado nas clonagens em questão:

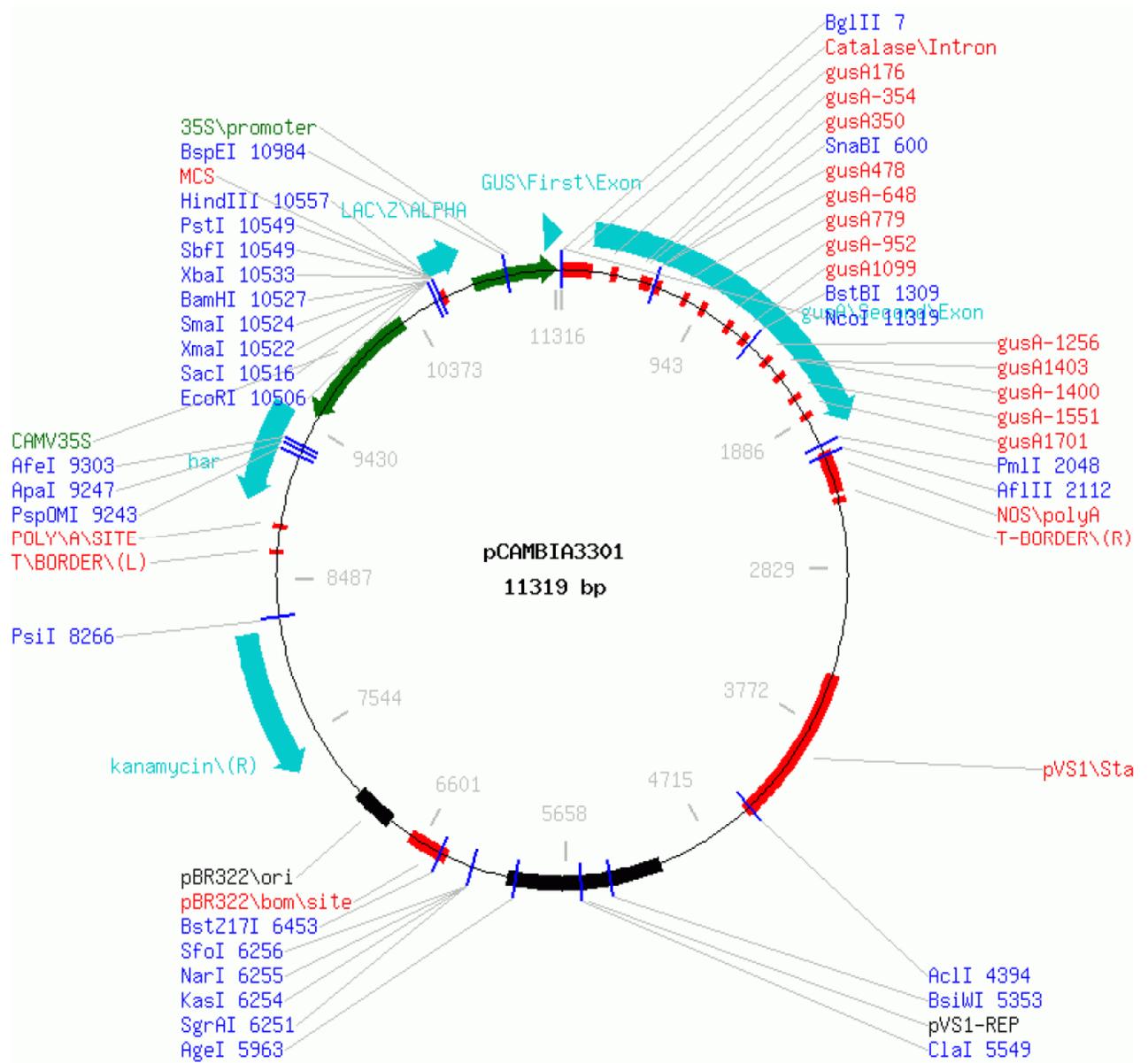


Figura 12: Mapa do vetor pCambia3301 usado nos experimentos de clonagem. Indicando sítios enzimáticos e resistência ao antibiótico kanamicina para seleção nas clonagens. Possui o gene GUS e um tamanho de 11319 pb.

As clonagens foram realizadas de acordo com o apresentado na tabela 3.

Após a digestão, realizou-se a inativação da enzima. O produto da reação foi aplicado em gel de agarose para separação dos fragmentos.

Tabela 3: Enzimas de restrição utilizadas para clonagem em diferentes vetores

Vetor - Inseto	Enzimas de restrição
pET-28a – CsARF inteiro	<i>SacII</i> e <i>NotI</i>
pET-28a –EXP (promotor mínimo)	<i>EcoRI</i> e <i>NcoI</i>
pGreenII– CsARF inteiro	<i>SacII</i> e <i>NotI</i>
pCambia3301–EXP(promotor mínimo)	<i>EcoRI</i> e <i>NcoI</i>

4.2 Eletroforese em Gel de Agarose

Foram utilizados géis de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-HCl 40mM; ácido acético 20mM; EDTA 1mM), para a corrida em uma voltagem fixa entre 100 - 110 Volts, dependendo do aparato de gel utilizado. Adicionou-se 10% do volume de *loading buffer* (0,1% de azul de bromofenol 0,1% de xileno - cianol e 15% de Ficoll 400) nas amostras e, para a obtenção de foto-documentação, usou-se o sistema EDAS de fotografia e análise de imagens (Kodak).

4.3 Purificação de DNA

As bandas que apareceram nos géis de agarose na altura esperada foram excisadas e o DNA foi extraído do gel utilizando-se o *kit QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN), conforme especificações do fabricante.

4.4 Reações de ligação

O DNA extraído do gel de agarose foi quantificado e, em seguida, realizou-se a reação de ligação, considerando-se a razão molar vetor: inserto de 1:3. Foi utilizado 1U da enzima DNA ligase (Fermentas), 2 μ L do tampão da ligação (10x) para um volume final de reação de 20 μ L. As reações foram incubadas por 4h a 21 °C ou mesmo 24h a 4 °C.

4.5 Transformação de bactérias competentes por choque térmico

Após a ligação, o DNA recombinante foi inserido em células de *Escherichia coli* cepa DH5 α competente, através da transformação por choque térmico. Para tanto, adicionou-se 1 μ L (para amplificação dos plasmídeos) ou 20 μ L (para produtos de ligação) do DNA (100ng) em 100 μ L do estoque de bactérias competentes, previamente descongelado e mantido em gelo.

As bactérias foram incubadas em gelo por 30 minutos e submetidas ao choque térmico: banho a 42°C por 2 minutos e incubação em gelo por 3 minutos. Após o choque térmico, adicionou-se 800 μ L de meio LB (Lúria-Bertani-Broth-líquido: extrato de levedura 5g/L; triptona 10g/L; NaCl 10g/L, pH 7,0) em seguida procedeu-se à incubação a 200rpm, por 1 hora, a 37°C. Para transformações de plasmídeos, 200 μ L desta suspensão foi plaqueado com o auxílio de uma alça Drigalski em uma placa de meio LB (Lúria-Bertani-Broth-ágar: extrato de levedura 0,5%; peptona 1%; NaCl; bacto-ágar 1,5%) contendo os antibióticos adequados para seleção dos transformantes. A placa foi então incubada a 37°C, por aproximadamente 16 horas. As colônias presentes na placa após as 16 horas de incubação indicam a presença do vetor que contém a seleção de resistência ao antibiótico utilizado (inoculou-se colônias isoladas de cada placa em meio líquido contendo o antibiótico apropriado, procedendo-os à agitação de 200rpm a 37°C por 16h).

4.6 Extração de DNA Plasmidial - minipreparação

Os plasmídeos recombinantes foram extraídos de *E. coli* DH5 α a partir do inóculo através de mini-preparações (“*minipreps*”) de acordo com as metodologias descritas por Sambrook (1989) e Ausubel (1995) e/ou de acordo com as especificações do fabricante do kit para extração de DNA da empresa *QIAGEN*.

4.7 Confirmações dos clones obtidos

Após a transformação, procedeu-se com a seleção dos clones através da análise de PCR de colônia com os oligonucleotídeos adequados, e aqueles que apresentaram os fragmentos de tamanho esperado foram sequenciados para confirmação da inserção na clonagem.

As reações de sequenciamento foram feitas com o uso do reagente *Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences/GE Healthcare)* numa reação de 10 μ L, contendo 4 μ L de *Dye Terminator*, de 2 a 3pmol do oligonucleotídeo iniciador (específico

para cada vetor) e de 300 a 600ng de DNA plasmidial para vetores de alta cópia ou de 500 a 800ng para vetores de baixa cópia. As reações foram incubadas a 95°C por um minuto e submetidas a 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 10 segundos a 50°C, e 4 minutos a 60°C em termociclador PCR System 9700 (Perkin Elmer). As amostras foram analisadas no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 *Genetic Analyser* (“*Applied Biosystems*”).

Para a confirmação de clonagem tanto do gene *Csarf* em pGreen, como do promotor mínimo *Csexp* em pCambia foi realizado sequenciamento.

Para sequenciar o vetor pGreen utilizou-se oligonucleotídeo iniciador ARF “*Foward*” (CAGAGGTGCATATGAAGTCTTGTAAC). Para o vetor pCambia, o oligonucleotídeo iniciador GUS A+ 40 foi utilizado.

4.8 “Western Blotting”

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas por eletroforese para uma membrana de polivinildifluoridina (PVDF) “*Immobilon-P*” (Millipore). A transferência foi realizada durante 60 minutos a 1mA por cm² de membrana/gel, utilizando-se o “*Semi-Dry Blotting System*” (“*The W.E.P. Company*”). O tampão utilizado para a transferência foi o “*Towbin Buffer*” que apresenta a seguinte composição: 25mM de Tris, 192mM de glicina, 3.5mM de SDS e 15% de metanol.

Terminada a transferência, as membranas de PVDF foram saturadas em solução de TBS-T (*Tris Buffer Saline* – TrisHCl 50mM pH8,0; NaCl 150mM; Tween-20 0,1% com 0,05% de Tween 20) contendo leite em pó desnatado (5%) por cerca de 18 h (“*overnight*”) a 4°C. Após lavagens com TBS-T as membranas foram incubadas com os anticorpos primários (monoclonal mouse anti-Flag, QIAGEN, utilizado na concentração de 0,05 µg/mL) por 1 hora. Em seguida, o anticorpo primário não ligado foi retirado por lavagens com TBS-T e em seguida o anticorpo secundário (*goat anti IgG mouse*) conjugado com peroxidase (HRP) (Santa Cruz “*Biotechnology*”, utilizado na concentração de 0,05 µg/mL) foi adicionado, incubando-se a membrana, novamente, durante 1 hora à temperatura ambiente, seguido por lavagens com TBS-T.

Para a revelação da membrana, adicionou-se uma mistura do reagente luminol (Santa Cruz “*Biotechnology*”) na proporção de 1:1 e a membrana foi exposta a filme radiográfico (Sigma-Kodak) pra detecção da quimiluminescência.

4.9 Expressão e purificação de proteínas PthAs

Foi realizada a indução da expressão de proteína plaqueando-se a cepa BL21DE3 com a construção pET28a-PthA (PEREIRA, 2011), em meio LB com kanamicina 50µg/mL a 37°C por 15 horas, logo após foram feitos pré-inóculos em meio LB (Lúria-Bertani-Broth líquido: extrato de levedura 5g/L; triptona 10g/L; NaCl 10g/L, pH 7,0) com kanamicina de uma colônia BL21DE3-pET28a-PthA a 37°C a 200 rpm por 15 horas. Fez-se um inóculo a 1% do pré-inóculo de BL21DE3-pET28a-PthA em meio LB com kanamicina a 25°C, 200 rpm até uma OD entre 0,6 e 0,8 em $\lambda = 600$ nm. Adicionou-se IPTG para 0,4 mM final, a 25°C a 200 rpm. Ressuspendeu-se as células em 20 mL de tampão lise A (20mM de Tris-HCl, 5mM de imidazol, 200mM de NaCl, 1mM de PMSF, 1mM de DTT e 20% de glicerol, pH 8.0) . Para a purificação, adicionou-se à amostra lisozima 0,3 mg/mL final, incubando-a no gelo por 1 hora e agitação periódica, A amostra foi “sonicada” com 8 pulsos de 20 segundos, com intervalos de 1 minuto, na amplitude de 38%, com a ponteira com a amostra mantida no gelo. Logo após foi centrifugada por 20 minutos a 17.000 g a 4°C, em centrífuga Sorval, rotor SS34. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,45 µm. Adicionou-se ao filtrado 500 µL de resina de afinidade por cobalto (TALON® “*Metal Affinity Resins*”) incubando logo após por 30 minutos a 4 °C em agitação constante, lenta e na horizontal. A amostra foi então centrifugada a 1000g. Após realizou-se uma lavagem com tampão A com centrifugação a 1000g, outra lavagem com tampão B (20mM de Tris-HCl, 50mM de imidazol, 200mM de NaCl, 1mM de PMSF, 1mM de DTT e 20% de glicerol, pH 8.0, 20 volumes da coluna). A amostra foi então eluída em 500 µL de tampão C (20mM de Tris-HCl, 500mM de imidazol, 200mM de NaCl, 1mM de PMSF, 1mM de DTT e 20% de glicerol, pH 8.0, 2 volumes da coluna) e novamente eluída nas mesmas condições.

4.10 Expressão de CsARF em extrato de reticulócitos de coelho

A expressão da proteína inteira foi realizada através de transcrição e tradução *in vitro* da proteína CsARF no plasmídeo pcDNA, para a confecção da proteína com cauda “Flag”, uma vez que tentativas de produção da proteína em *E. coli* não foram bem sucedidas. O sistema de expressão em reticulócitos de coelho foi realizado segundo as indicações do “*Kit TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems*”(PROMEGA), em reações de uma hora e trinta minutos em um total de 50 µL ou 25 µL de reação (tabela 4). O produto dessa reação foi utilizado para as reações de EMSA (gel “*shift*”).

Tabela 4: Componentes do kit de expressão de reticulócitos

Componentes	Volume (µL)
TNT® “Rabbit Reticulocyte Lysate”	25
TNT® “Reaction Buffer”	2
TNT® “RNA Polymerase” (SP6, T3 or T7;)	1
“Amino Acid Mixture, Minus Leucine” 1mM	0.5
“Amino Acid Mixture, Minus Methionine” 1mM	0.5
RNasin® “Ribonuclease Inhibitor” (40u/µl)	1
“DNA template” (0.5µg/µl)	2
“Transcend”™ tRNA	1
Água para um volume final de 50µl	17
Volume final	50

4.11 “Gel Shift Assays – EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)”

Desenhou-se quatro oligonucleotídeos para a região promotora mínima denominada CsEXP que possui uma região TATA-“box” e uma de TGTCTA (provável AuxR) adjacentes. Foram realizados ensaios com as quatro sondas de DNA, a saber, uma selvagem com as regiões TATA-box e TGTCTA, outra com o TGTCTA mutado e outra com o TATA-“box” mutado. Além disso, a sonda PR5-Comp2 também foi testada. Depois de devidamente anelados em tampão TE 1X os óligos foram aquecidos a 95°C e resfriados 5°C a cada 2:30 minutos até 25°C, permanecendo à temperatura ambiente por 2 horas e em seguida estocados em freezer – 20°C, os óligos foram marcados utilizando o “*kit Megaprime DNA Labeling System da Amersham Biosciences*” conforme instruções do fabricante. A reação de “*shift*” foi montada da seguinte forma: 0,04mM de sonda, 0,2-0,6µg de proteína, 1mM de DTT, tampão de ligação (12mM de Tris-HCl pH 7,5, 60mM de KCl, 1mM de DTT, 2,5% de glicerol, 5mM de MgCl₂, 0,05% de NP-40, 0,2mM de EDTA) e volume final acertado para 10µl com água MiliQ autoclavada. As sondas de DNA marcadas com radioativo gama foram incubadas com as proteínas PthA e ou CsARF no gelo por 30 minutos na presença de tampão de ligação. O gel de poliacrilamida 6% não desnaturante foi previamente equilibrado por uma pré-corrída com tampão TBE 0,5%, 100V, 350mA por 15 minutos a 4°C e logo após as amostras foram aplicadas ao gel e a corrida foi realizada nas seguintes condições: TBE 0,5X, 100V, 350mA por 60 minutos a 4°C. Após a corrida o

gel foi exposto ao filme (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare) entre um ou sete dias a -80°C e em seguida revelado com as devidas soluções de revelação e fixação. Os ensaios de “gel-shift” foram realizados de acordo com o protocolo de KAY (2007) e Sambrook (2001).

4.12 Origem e preparação do material vegetal

Foram preparadas sementes de laranja doce retirando-se tegumentos e posteriormente desinfetando-os em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) por 15 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes em água destilada e esterilizada e inoculadas em tubos de ensaio (150 x 25 mm) contendo 10 mL de meio de cultura para germinação, contendo metade da concentração dos minerais nutrientes do meio MT (MURASHIGE e TUCKER, 1969), suplementado com 100 mg/L de mio-inositol, 25 g/L de sacarose e 6 g/L de ágar. Ajustou-se o pH do meio para $5,7 \pm 0,1$, com o uso de NaOH (1 N) antes da adição do ágar, após a adição deste, realizou-se esterilização em autoclave a 121°C, 1,5 Kgf cm⁻² de pressão, durante 20 minutos. As sementes foram incubadas à temperatura de 27 ± 2 °C, em ausência de luz, por um período de quatro semanas e depois duas semanas expostas à luz. Após esse período, segmentos de epicótilo (1 cm) foram isolados das plântulas, sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, e utilizados nos trabalhos de transformação genética, transiente e permanente.

4.13 Condições de cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*

Cultivou-se *Agrobacterium tumefaciens* (cepa EHA105) em meio YEP suplementado com o antibiótico de seleção adequado (o vetor pCAMBIA possui resistência à kanamicina; as transformações com pGreen que age conjuntamente com pSOUP, exigem kanamicina referente à resistência de pGreen e tetraciclina referente à resistência de pSOUP) na concentração molar adequada ao apresentado pela tabela 5, estreptomicina 100 mg/L e rifampicina 100 mg/L por 48 horas a 28°C em um frasco *Erlenmeyer* (50 ml), incubado sob agitação a 200 rpm, 28°C, por 16 horas. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 3500 rpm, à temperatura ambiente, por 5 minutos. O precipitado ressuspenso em meio MS líquido suplementado com acetoseringona 100 mM (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Tabela 5: Concentrações finais dos antibióticos.

Antibiótico	Concentração (ug/mL)
Ampicilina	20
Kanamicina	10
Rifampicina	150
Estreptomicina	10
Tetraciclina	10

4.14 Transformação genética com *Agrobacterium tumefaciens*

Os procedimentos de transformação genética de citros foram realizados de acordo com OLIVEIRA (2009). Segmentos de epicótilo (1 cm) derivados de tecidos juvenis foram cortados transversalmente e incubados na suspensão bacteriana contendo a construção de interesse (*CsEXP* ou *CsARF*) por 15 minutos a uma concentração de 10^8 - 5×10^8 ufc/mL. Após este período, os explantes foram colocados em papel-filtro estéril para a retirada do excesso de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105), em seguida, transferidos para o meio de co-cultivo, composto pelos sais MS e 100 mM de acetoseringona. Após 2 ou 3 dias de co-cultivo a 27°C, mantidos ao abrigo da luz, os explantes foram recuperados e congelados em nitrogênio líquido (transformação transiente) para posterior extração de RNA total e mRNA e ou para a realização do teste do gene repórter GUS; ou foram transferido para o meio MS sólido para a construção de clones permanente. As brotações foram transferidas após a fase de indução (60 dias), para placas de petri contendo 25 mL de meio MT suplementado com 1 mg/L de ácido giberélico (GA3), kanamicina e Timentin® para alongamento (formação de raiz). Após 60 dias, os ápices caulinares das brotações alongadas de laranja doce foram transferidas para o substrato terroso.

4.15 Ensaio histoquímico da atividade GUS

Epicótilos de laranja doce ou folha de tabaco infiltrados com o *A. tumefaciens* adequado foram transformados com a construção pCambia3301 ligada ao promotor mínimo *Csexp* dirigindo o gene repórter GUS, foram incubados com o substrato “*X-Gluc*” (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucuronico, sal cicloexilamonio) 1 mM em 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0 até 37°C por 24 horas no caso de epicótilos de laranja e 48 e 72 horas no caso no tabaco. Logo após, foram lavados com etanol 92% para a descoloração.

4.16 Ensaio fluorimétrico da atividade GUS

Epicótilos de laranja doce transformados com a construção pCambia3301 ligada ao promotor mínimo *Csexp* dirigindo o gene repórter GUS foram lisados por congelamento com nitrogênio líquido e moídos em um almofariz, posteriormente realizou-se uma extração em 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, 10 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 0,1% de sódio lauril sarcosina, 10 mM de 2-mercaptoetanol (tampão de extração). A reação fluorogênica foi realizada no tampão de extração 1mM 4-metilumbeliferil-β-D-glicosídeo (MUG). A reação foi incubada a 37 °C e alíquotas de 200 μL foram removidas e adicionadas a 0,8 mL de tampão de parada (0,2 M Na₂CO₃). Mediu-se então a fluorescência a excitação de 365 nm, e emissão de 455 nm.

4.17 Medida de proteínas totais dos extratos de epicótilos

A medida da quantidade de proteínas totais dos extratos de epicótilos de laranja doce transformados para o ensaio de atividade GUS foi realizada de acordo com o “*Kit BCA Pierce- Thermo Scientific*”, e as leituras foram feitas em um programa nanodrop em um espectrofotômetro como apresentado na tabela 6. Tal programa possui a análise para o kit BCA e calcula automaticamente as concentrações de proteínas totais.

Tabela 6: Quantificação de proteínas totais em epicótilos de laranja doce transformados para a realização do teste GUS (“*Kit BCA Pierce- Thermo Scientific*”).

Amostra	Valores médios (mg/mL)
CsEXP	99
CsEXP + 2,4D (auxina)	87,75
CsEXP + PthA2	88,2
PBI	81

4.18 Ferramentas de Bioinformática

As buscas por similaridade de sequência foram efetuadas com o algoritmo BLAST: www.ncbi.nih.gov/blast; Análises comparativas de alinhamento de sequências e a árvore filogenética foram feitas usando o algoritmo CLUSTALW: www.ebi.ac.uk/clustalw.

5 Resultados e discussões

5.1 Clonagem da região promotora mínima CsEXP

Gel de digestão de CsEXP para clonagem:

A fim de inserir a região correspondente à promotora mínima, retirou-se do promotor CsEXP a região de 340 pb (pares de base) de pGEM-CsEXP (SOUZA, 2010) que havia sido clonado previamente com a finalidade de colocá-la no vetor pCAMBIA3301 (figura 13), um vetor de expressão do gene GUS β -glucuronidase *in vivo*. Tal vetor possibilita testar se uma dada região do DNA funciona como promotora, isto é, se ela é capaz de expressar β -glucuronidase indicando a funcionalidade da região testada.

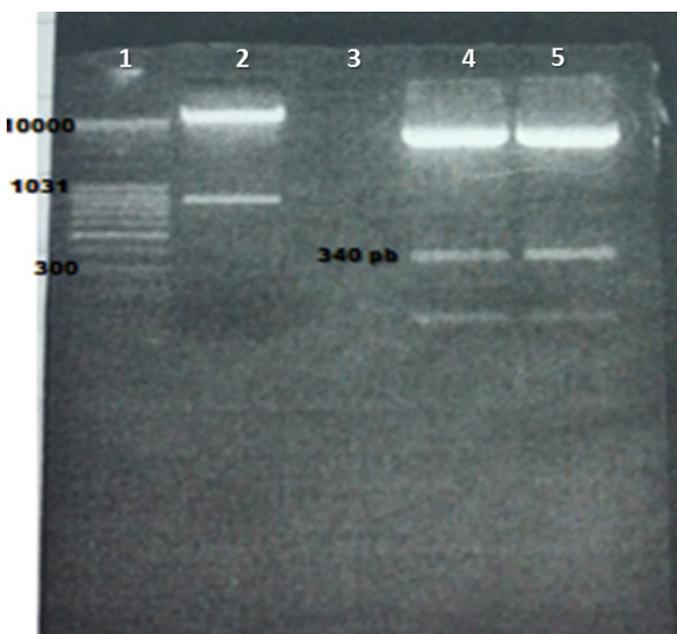


Figura 13: Primeira canaleta: marcador “*MassRuler DNA Ladder Mix ready-to-use*”; Segunda canaleta: pCAMBIA3301 digerido com *NcoI* e *EcoRI*; quarta e quinta canaleta: pGEM-CsEXP digerido com *EcoRI* e *NcoI* (provavelmente “*supercoiling*”) referindo-se à banda correspondente à CsEXP 340 pb (com marcação em preto 340 pb), posteriormente confirmado por sequenciamento.

A região chamada de região promotora mínima depois de digerido com as enzimas *EcoRI* e *NcoI* resultou no fragmento apresentado na figura 14. A figura 15 apresenta o sequenciamento da expansina com a região mínima que possui os elementos cis regulatórios em destaque.

```
5' TTCCATGACCCCCACCCCCGGAAGAGAAGAAAGGAAGAAAATTAAATATGACAAATATAAGATAACTGAAACGGTT
GATAAATGCATGTGGGGGTGGGGCCAATTGAGATAGCGGTTGGTGCTCTAACAAGAACATTTGCATGTGCAGTTTGATCCC
TGTAACAATGCCTGACGAAATGTGATTTAATTCGGTGGCTGTAGCTTTACAAAGTCCGCATCTCACTGTCTATATAAAGGA
GGCTCCATTCCCCCTGACTAAGGCACTAAGCACTCAAAGCATCTCTCTTTTTCTTAACAAAAAACACATAAACATAAGC
AGCCAGCAGTAGCAGCCA 3'
```

Figura 14: Sequência de pares de base de DNA na direção 5'→3' correspondente à região mínima promotora após a digestão para a clonagem final

Sequência genômica da Expansina de *C. sinensis*:

```
TTAACTAGAAATGAAAGCATCCTAATTCATATGAAAATGATGTATGAATACAATTGACCG
TGATATTCGGGACTTGTCATGTGCTCATAACATGGTAGGTCCCTCATCAAATCCCTCCCA
CGTAAGTCCATACAAAATTTGTAGACAAAAATATGAATACATTGTTGACTTGAGATTTT
ATAATAATCCCACTTTGGTTTAATAATTTCAACGATGAATTATCATAAGTTACACCCTTA
TTTTTGATTTCCAAATGCATCGATCTATGAGATTTACCACGTGTGTGATCCCGATTCC
ATACTGTATAAGTGTATATGCTAGTGGTTACTTATGTTTGATGATTTAAAAACCTTATTA
CAAAGCATATTATAACAACCGACGATCGAGGGGATTCCGTGGAGTCTCTGCTGTGTATAT
CTTTTGATGCCTCATCTGTAATACTAAAATATGATTGGTTTGTGGGGATTAACATATAGT
CCTGTACGAGAAATTTAATTAAAACCCAGTAAGCTTAAACAAATTGGGAAAACTTTTC
TGACCAACAAGCAGCACATTGCACTAGAAAAGTAAGGCTTTAATTTGAGATGCTCTTTG
CTTGCAAGTCGGTTGCCTCCTAATCCCTGCATATGCTTCTTACCGTTTCAATTCATGCA
TCAAACTGGTCACTTTTGGTGACATCTTTAGACTAATTAGGCAAAAATTTCTTTCATAC
AAAGCATGTTTATTTTATAATGACAATTGTAATTTGGGAGCCCTAAGTAACATCCCACTC
ACATGAGTTCACGTGACTGGATGTAAGTTACATTATCATTTCCTTATAATTTTACAAT
TACAAGCTTGTCAGTACCAATCTAAACAGCTTTATATCAAGAGGATTTAAAGTTTATAA
TGATAGTTTATCATTATAAGTAAAAATTGCGATTACTTAAATAGCTTTGTCATGACATT
GTTTGATGTCGGGGTCCAAAAAATTGGATCTACCCCAATAATTGAAAAAATAATCA
TTCCGTGATACACATGGAAATTAACCTGAAATCCCTGTATACATGTGGGAAGGAAAGGAC
TAATGGATGGTTTAAACATGAACTTGACCCGCTTTTGTAAGAAATGAAAAACATTAAGAT
TTGAGCACAATGAACTTTGGACTAGAGAGAGCAACGAAAGAACAAGAATGCTGACAAAAT
TAGCAACTACTTTATGATACATTTTCCACAGCCAACCAAAACGGACCTCAGGAACAAGAA
ATTAACCTCAAGTCTCCTTAATCAAAGGGCTTAAAAGTTGAGCTGATTTGCGGTATTTCA
```

GGCAGTTTAAGTAGAAATTTATGCATTATCAAATGTAGAAAGTATTGAAGAGTGAAGAAAG
GGAAGAAAATTAATATGACAAATATAAGATAACTGAAACGGTTGATAAATGCATGTGGG
GGTGGGGCCAATTGAGATAGCGGTTGGTGCTCTAACAAGAACATTTGCATGTGCAGTTG
ATCCCTGTAAACAATGCCTGACGAAATGCGATTTAATTCGGTGGCTGTAGCTTCACAAAAGT GA
CCGCATCTCACGTGCTATATAAAGCAAGCTCCATTCCCCTGCACTAAGCCACTAAGCAC
TCAAAGCATCTCTCTTTTTCTTAACAAAAAACACATAAACATAAGCAGCCAGCAGTAGC
AGCCATGACCAATATTGCAGCATCATCTAGCGTTGCTCTCCTTTTGTGTTGTGCTCAATTT AuxRE syntetic
TTGCTTTCGTGGCACATTTGGAGACTATGGTGGTGGTGGCAAGTGGCCATGCAACTTT
CTATGGCGGGGTGATGCTCCGGCACAATGGGTAAGTGATAAGTAACAAGTAAAAACA
TTTGCTCTTTTTGTTGCATAACTTTTTGGTCAATTTGCCATGATGGCAATTGATGTTTTC
TACTTGGTACTGTAGGTGGTGTCTGTGGGTATGGCAATTTGTACAGCCAAGGCTATGGGA
CTAACACTGCAGCACTCAGTACCCTCTATTCAACAATGGCCTAAGCTGTGGTTCATGCT
ATGAAATGAAATGTGAAATGACCCCAAGTGGTGCCTCCCCGGCTCCATCATTGTCACCG
CCACCAACTTCTGCCACCTAACCTTGCCCTGTCTAACGACAACGGCGGTTGGTGCAATC
CTCCCCTCCAGCACTTTGACATGGCTGAGCCCGCTTTCTTGCAAATTGCCCAATACCGCG
CCGGCATCGTCCCAATTTCTTCAGAAGGTAACAACATATCACATTATAAAGTTGATGTC
ACTACACTTGTAAGCCTGTATGAATCTGATTTTGACATGTTTCTATCCGGATTTGTAATC
AGGATCCCGTGTGCGAAGAAAGGAGGAATAAGGTTTACCGTCAATGGACACTCATACTTC
AACCTGGTTTTGATCACAAATGTCGGAGGAGCAGGAGATGTACATTCAGTATCAATCAAG
GGTTCAAAGACTGGATGGCAAGCAATGTCAAGGAAGTGGGGCCAAAATTGGCAGAGCAAT
TCTTATCTTAACGGCCAAAGTCTTTCTTTCCAATTGACAGCCAGTGACGGCAGGACTGTG
ACTAGCAACAATGTTGTGCTGGAAATTGGCAATTTGGGCAAACCTTTGAGGGTGGTCAG
TTTTAGATTTTAAAAAGTGAATCAGAATTTGTATATTTAATTGAATTTGGCACTGTTG
TGAGGGAGGAAGGGTGAGAATAGGGTAGGTGAGGCTCAGGCCTGGCCGATGTGGCTGT
CTTGTGCTGTGGTGGTCTGTTGGCACCCGCTAGGCCTCTATAAATAGAAATGATTGTTG
TCTATATATAGTTATTACTTCAATTGAATGAACGGGTATAATTTCAATTCAGCGTTGTGAT
TTCTGGTTATCATTTGAGACATCAGTTAAAAGTTTATTGATAAAAAAATTTCAATCTTA
ATGTGTAATTCAGAATTTTTTTTTGATGAAAAATAAAAAATTTCTCTCCAATTATTAAA

Figura 15: Sequência genômica de *CsEXP de C. sinensis*. O destaque do texto evidenciado pelas bases de nucleotídeos em cor amarela é referente à região do promotor mínimo clonado com os elementos cis-regulatórios destacados em verde e azul.

Análise do clone “pCambiaGus6” por sequenciamento

Sequência do clone pCambiaGus6 com primer GusA+40:

```

CCCGGGGGTTTGGGGTTTCTAAGGACGGACGAGTCGTCGGTCTGTAACATCATCATCATAGACACACGAAATAA
AGTAATCAGATTATCAGTTAAAGCTATGTAATATTTACACCATAACCAATCAATAAAAAATAGATCAGTTAAAGAAAGA
TCAAAGCTCAAAAAATAAAAAAGAGAAAAGGGTCTAACCAAGAAAATGAAGGAGAAAAACTAGAAATTTACCCCTCAGATC
TACCATGGCTGCTACTGCTGGCTGCTTATGTTTATGTGTTTTTTGTTAAGAAAAAGAGAGATGCTTTGAGTGCTTAGTGC
CTTAGTGCAGGGGAATGGAGCTCCTTTATATAGACAGTGAGATGCGGACTTTGTAAGCTACAGCCACCGAATTAATC
ACATTCGTCAGGCATTGTTACAGGGATCAAACGACATGCAAATGTTCTTGTAGAGCACCAACCGCTATCTCAATTGG
CCCCACCCACATGCATTTATCAACCGTTTCAGTTATCTTATATTTGTCATATTTAATTTTCTTCCCTTTCTTCTTCC
GGGGGTGGGGGTCATGGAATTCTGGTGCAGATCAATCACTAGTGAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCTGTGTGA
AATTGTTATCCGCTCACAATTTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAG
CTAACTCACATTAATTTGCGTTCGCTCACTGCCGCTTTCCAAGTCGGGAACCTGTGTCGTGCCAGCTGCAATTAATGAAT
CGGCAAACGCGCGGGAGAAGCCGTTTGCCTAATTGCTTAGAGCAGCTTGCCACATGGTGGGAGCACGACACTCTTCGTCTT
CTTTCCAAGGAATATTTCCAAGAAATCCAGGTTCCAGAAGACAAGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTTAATCCGGAAC
CTCTCGGATCCATTGGCCAAGCTATCTGTCAATTCCTATCAAGGACACGTTGAGAAAGA

```

Figura 16: Pares de bases obtidos pelo sequenciamento genômico do clone GUS6 para comparação à sequência genômica de CsEXP.

```

seqGus6      GAAATCACTAGTGATTGATCTGCACCAGAATTCATGACCCCCACCCCCGGAAGAGAA 60
pEXP         -----GATCTGCACCAGAATTCATGACCCCCACCCCCGGAAGAGAA 44
                *****

seqGus6      GAAAGGGAAGAAAATTAATATGACAAATATAAGATAACTGAAACGGTTGATAAATGCAT 120
pEXP         GAAAGGGAAGAAAATTAATATGACAAATATAAGATAACTGAAACGGTTGATAAATGCAT 104
                *****

seqGus6      GTGGGGTGGGGCCAATTGAGATAGCGGTTGGTGTCTAACAAGAACATTGCATGTGCA 180
pEXP         GTGGGGTGGGGCCAATTGAGATAGCGGTTGGTGTCTAACAAGAACATTGCATGTGCA 164
                *****

seqGus6      GTTTGATCCCTGTAACAATGCCTGACGAAATGTGATTTAATTCGGTGGCTGTAGCTTTAC 240
pEXP         GTTTGATCCCTGTAACAATGCCTGACGAAATGTGATTTAATTCGGTGGCTGTAGCTTTAC 224
                *****

seqGus6      AAAGTCCGCATCTCACTGTCTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGCACTAAGGCACTA 300
pEXP         AAAGTCCGCATCTCACTGTCTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGCACTAAGGCACTA 284
                *****

seqGus6      AGCACTCAAAGCATCTCTCTTTTCTTAACAAAAAACACATAAACATAAGCAGCCAGCA 360
pEXP         AGCACTCAAAGCATCTCTCTTTTCTTAACAAAAAACACATAAACATAAGCAGCCAGCA 344
                *****

seqGus6      GTAGCAGCCATGG 373
pEXP         GTAGCAGCCATGG 357
                *****

```

Figura 17: Relatório de dados gerado pelo programa BLAST de comparação de pares de base de DNA. De acordo com o relatório de dados gerado pelo programa BLAST. Apresenta-se acima a análise por comparação de alinhamentos das sequências genômicas correspondentes ao clone testado e a sequência genômica do promotor de expansina. Neste mesmo relatório de dados o “seqGus6” se refere ao clone a ser testado e o “pEXP” se refere ao promotor de expansina apresentado. Quando o asterisco “*” é apresentado,

conclui-se que o nucleotídeo “seqGus6” é correspondente ao “pEXP”, ou seja, comprava-se a clonagem. De acordo com a sequência genômica gerada pelo software do BLAST, pode-se comprovar pela análise de que tal sequenciamento de DNA se trata do CsEXP de *C. sinensis*, pois quase que o total das bases de nucleotídeos são iguais, inferindo-se, portanto, que se trata da região promotora de expansina.

Através de sequenciamento genômico e de acordo com a análise de comparação do programa BLAST o clone6 pCambia3301-CsEXP foi confirmado positivamente, e a seguir foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) sendo posteriormente usado para transformar plantas.

5.2 Confeção de oligonucleotídeos para ensaio Gel “Shift” com as proteínas CsARF e PthA2

Os oligonucleotídeos (sequência de DNA) foram confeccionados para experimentos de gel “shift” com mutações sítio dirigida em regiões que correspondem a sítios de ligação para proteínas no DNA. A região EXPPro corresponde a região selvagem, ou seja, sem mutação da região promotora do gene de expansina. A região mutante 1 (MUT1) apresenta mutação no sítio de ligação à proteína CsARF. A região MUT2 contém uma mutação no TATA-box (um provável sítio de ligação para a proteína PthA). Estes oligonucleotídeos foram confeccionados por Souza (2010).

Os oligonucleotídeos apresentados na figura 18 foram utilizados no experimento gel “shift” com a proteína CsARF recombinante e com a proteína PthA recombinante:

EXPProWTfoward	CCGCATCTCACTGTCTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
EXPProWTreverse	TGCAGGGGGAATGGAGCCTCCTTTATATAGACAGTGAGATGCGG
EXPProMUT1foward	CCGCATCTCACGGACTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
EXPProMUT1reverse	TGCAGGGGGAATGGAGCCTCCTTTATATAGTCCGTGAGATGCGG
EXPProMUT2foward	CCGCATCTCACTGTCTACAGAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
EXPProMUT2reverse	TGCAGGGGGAATGGAGCCTCCTTTCTGTAGACAGTGAGATGCGG

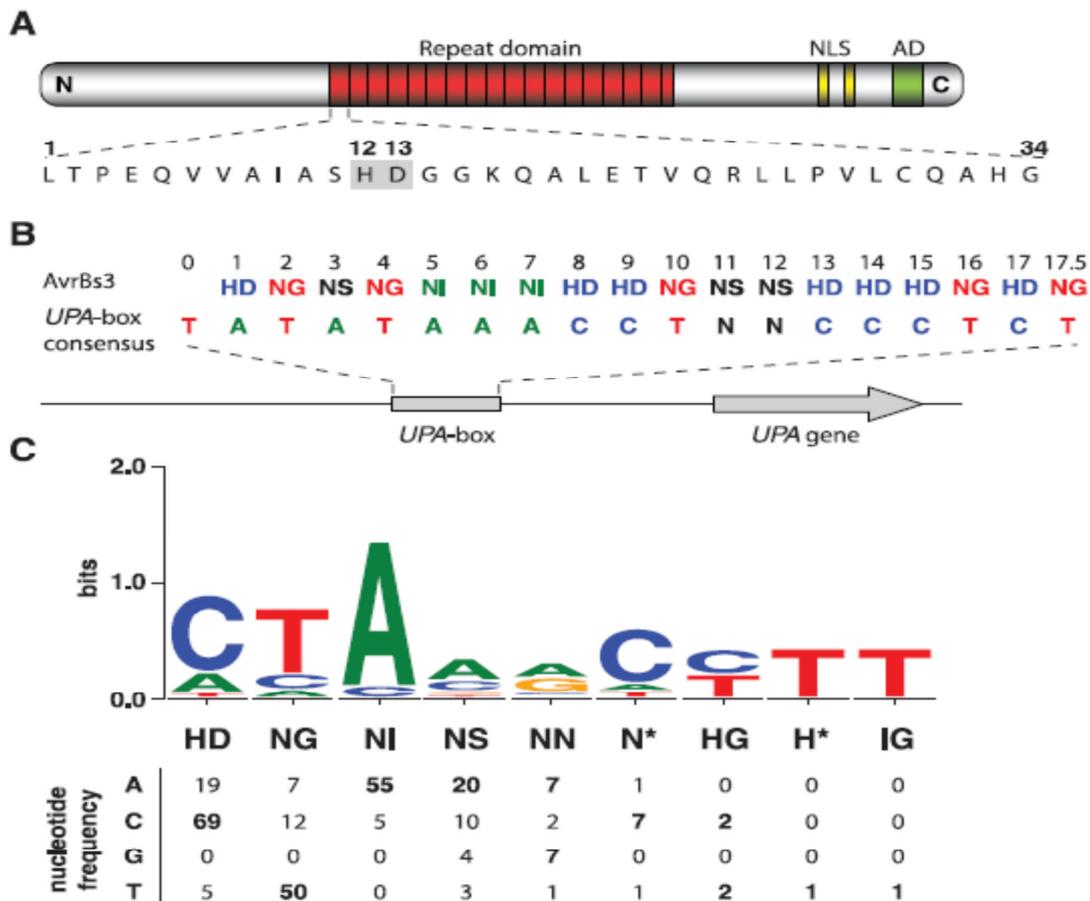
Mut1: mutação no provável Box AuxRE

Mut2: mutação no provável TATA-box

Figura 18: Sequência de DNA dos oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de “Gel-Shift”. Confeção de sonda na região mínima do promotor de expansina para possível ligação a proteína PthA2: A região que contém o “box” AuxRE foi encontrada de acordo com o que

está descrito por SOUZA (2010) quando se analisou região 5' a montante do gene *CsEXP* onde foi identificada uma sequência de DNA TGTCTA um provável "box" AuxRE que está justaposta ao possível TATA-"box" do promotor do gene. Essa mesma região é muito similar às regiões de DNA "upa-boxes" de ligação das proteínas AvrBs3 em genes regulados pela mesma, como "upa20" e principalmente "upa10". Além disso, a região do provável TATA "box" é muito similar a uma outra região promotora isolada do gene PR5.1 de citros, também "up" regulado por *X. citri* (CERNADAS, 2008), e que é alvo de ligação de PthAs (PEREIRA, 2010). Por este motivo, pode ser uma região de co-interação para as duas proteínas, pois contém prováveis sítios de ligações. Esta pesquisa verificou se as proteínas *CsARF* e a proteína PthA2 reconhecem sequências no promotor do gene *CsEXP*. Outra possível região de interação para proteína PthA foi encontrada de acordo com o trabalho de Boch (2009) que prevê que os domínios centrais da proteína PthA se ligam a bases de DNA de forma previsível, esta região foi então testada como possível região de ligação para a proteína PthA2. O "box" predito para PthA2 tem a sequência ACACACCTCTTTAAT (comp 2) (PEREIRA, 2011). O promotor mínimo do gene, que contém o "box *AuxRE-like*" utilizado nos testes de atividade da β -glucuronidase, possui uma sequência similar ACACATAAACATAAGC que apesar das trocas das bases de DNA o sítio de ligação corresponde a sequências equivalentes e pode ser uma região de ligação para a proteína PthA.

A figura 19 mostra o modelo apresentado por Boch (2009), onde foi descrito a especificidade de diresíduos (resíduos duplos de aminoácidos) da região central de uma proteína efetora a uma base de nucleotídeo de acordo com a preferência na frequência de ligação do diresíduo ao nucleotídeo.



Boch, J. et al. Science, 2009. 326:1509.

Figura 19: Modelo de DNA de alvo especificidade às proteínas efetoras. (A) Modelo de uma proteína efetora com o centro com conjuntos repetitivos, os domínios NLS e AD são mostrados. Em cinza a sequência de aminoácidos da primeira repetição da proteína AvrBs3. Os aminoácidos 12 e 13 hipervariáveis estão sombreados em cinza. (B) RVD: aminoácidos hipervariáveis de AvrBs3 estão alinhadas ao “box” Upa. (C) Repetições de sequências alvo previstas para ligação às proteínas efetoras, que foram alinhadas manualmente. Os nucleotídeos de cadeia de DNA correspondem aos aminoácidos hipervariáveis. Cada repetição foi contada com base nas combinações de efetores com genes alvo identificados experimentalmente. Barra vertical: frequência com que o nucleotídeo se liga ao diresíduo (resíduo duplo). Barra horizontal sequência de RVD de proteínas efetoras (BOCH, 2009).

RVD (“repeat-variable diresidues”) das proteínas PthA:

PthA1
 NI N* NI N* NI HD HD N* NI HD NI HD N* NI HD HD NG
 PthA2
 NI HD NI HD NI HD HD NG HD NG NG NG NI NI NG
 PthA3
 NI HD NI HD NI NG HD NG NG NI NI NI NI HD NG
 PthA4
 NI N* NI NI NI HD HD NG HD NG NG NG NS HD HD NG NG

A sequência de DNA a ser analisada segue de acordo com a sequência de RVD (“repeat-variable diresidues”) na região central de repetições de proteínas efectoras. Os alinhamentos feitos de acordo com Boch em 2009 demonstram que a sequência de RVD de PthA2 se liga à sequência ACACACCTCTTTAAT (comp 2: sequência predita para ligação do RVD de PthA2). A figura 20 mostra como serão as bases de DNA para ligação de PthA2 segundo o trabalho de Boch (2009).

Sequência de RVD de PthA2:

NI HD NI HD NI HD HD NG HD NG NG NG NG NI NI NG

Proteína PthA2:

RVD: NI HD NI HD NI HD HD NG HD NG NG NG NG NI NI NG

comp 2: A C A C A C C T C T T T T A A T

PthA2

NI HD NI HD NI HD HD NG HD NG NG NG NG NI NI NG

A C A C A C C T C T T T T A A T

C A C A C A A C A C C C C C C C

* T * T * T T A T A A A A * * A

Figura 20: Apresentação de sequências de DNA com maior probabilidade de ligação ao RVD de PthA2 de acordo com o trabalho de Boch em 2009. Em amarelo esta a sequência predita, ou seja, a sequência que apresenta a maior frequência de aparecimento do nucleotídeo para o diresíduo apresentado. Por exemplo, para o diresíduo HD o nucleotídeo de maior frequência encontrado no trabalho de Boch em 2009 foi a adenina “A”. Em vermelho estão os nucleotídeos que apresentaram a segunda maior frequência para o RVD da proteína PthA2. E em verde a terceira maior frequência de nucleotídeos para ligação ao RVD de PthA2. O asterisco “*” a ausência da base de nucleotídeo para ligação.

A sonda EXPPthA2: ACACATAAACATAAGC

As cores seguem a lógica de frequência supracitada e apresenta 7 nucleotídeos de maior frequência, 4 nucleotídeos de segunda maior frequência e 4 de terceira maior frequência.

A figura 21 mostra a comparação por alinhamento das sondas testadas.

Alinhamentos das sondas em relação à sonda predita Comp2:

```

A C A C   A T A A A   C A T A   A G C           nova sonda EXPPthA2
* * * *   *                               * *
A C A C   A C C T C   T T T T   A A T           Comp2 (sonda predita para PthA2)
                                     * *
C T G T   C T A T A   T A A A   G G A           ARF-tata box (CsEXP)

```

Figura 21: Alinhamento das sondas de DNA testadas em relação a sonda predita pelo trabalho de Boch em 2009. O asterisco “*” representa a base de nucleotídeo que aparece na sonda predita e na sonda comparada representando portanto a igualdade nas bases de nucleotídeos.

Os asteriscos “*” indicam que os nucleotídeos são iguais. A sonda EXPPthA apresenta uma igualdade de base de nucleotídeos maior, com a sonda predita Comp2, como pode ser verificado pois existem sete nucleotídeos iguais enquanto que a sonda selvagem “W” (CsEXP wt) apresenta dois nucleotídeos iguais.

Região mínima isolada, com função promotora, até a atualidade, do promotor de expansina (figura 22):

```

5' GATCTGCACCAGAATTCCATGACCCCCACCCCCCGGAAGAGAAGAAAGGGGAAGAAAATTAATATGACAAATATAAGA
TAACGTAAACGGTTGATAAATGCATGTGGGGGTGGGGCCAATTGAGATAGCGGTTGGTGCTCTAACAAGAACATTTGCATG
TGCAGTTTGATCCCTGTAACAATGCCTGACGAAATGTGATTTAATTCGGTGGCTGTAGCTTTACAAAGTCCGCATCTCAGT
GTCTATATAAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGCACTAAGGCACTAAGCACTCAAAGCATCTCTCTTTTTCTTAACAAAAAAC
ACATAAACATAAGCAGCCAGCAGTAGCAGCCATG 3'

```

Figura 22: Região promotora mínima direção 5'→3' com destaque nos nucleotídeos correspondentes as sondas de DNA utilizadas no experimento de “gel-shift”.

Tabela 7: Oligonucleotídeos em comparação com a região mínima.

Nome Oligonucleotídeos	Sequência 5' → 3'
Selvagem (CsEXP)	CCGCATCTCACTGTCTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
MUT1	CCGCATCTCACGGACTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
MUT2	CCGCATCTCACTGTCTACAGAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
EXPPthA2 (Selvagem 2)	TCTTTTTCTTAACAAAAAACACATAAACATAAGCAGC
PR5-Comp2	TACACATTCTAAAATTTACACACCTCTTTTAATATTCC

Em azul na figura 22 se destaca a região da sonda selvagem (CsEXP wt) e em vermelho a sonda feita por comparação ao trabalho de Boch (2009) (EXPPthA2R). A tabela 7 apresenta os oligonucleotídeos usados no experimento de “gel shift” em azul CsEXP wt, em vermelho EXPPthA2, a região sublinhada em MUT1 corresponde a mutação no “box” AuxRE e a região sublinha em MUT2 a mutação no TATA “box” e na sonda PR5-Comp2 em verde a região predita da sonda predita Comp2 para ligação a proteína PthA2.

Sequência dos oligonucleotídeos EXPPthA2F e EXPPthA2R que foram anelados a fim de fazer sonda de DNA para marcação com radioativo e posterior experimentos de gel “shift”:

Oligonucleotídeo EXPPthA2F:

TCTTTTTCTTAACAAAAAACACATAAACATAAGCAGC

Oligonucleotídeo EXPPthA2R:

GCTGCTTATGTTTATGTGTTTTTTGTTAAGAAAAAG

5.3 Clonagens de CsARF

As clonagens de CsARF inteiro no vetor pGreen foram realizadas para serem utilizadas em experimentos de transformações transitórias em epicótilos de laranja doce para super expressão de CsARF. O *template* contendo CsARF vetor pGEM T-Easy, clone previamente existente (SOUZA, 2010).

Gel de digestão de pGEM com CsARF inteiro:

Foi realizada uma digestão de pGEM T-Easy contendo CsARF inteiro utilizando as enzimas *SacII*, *NotI* e *PvuI*, houve a liberação de quatro fragmentos e CsARF com 2875 pb (pares de base) aparece em ~2,5 kb, e outros de 1780pb, 1100pb e 200pb. Esta digestão foi realizada desta forma, pois CsARF tem um tamanho similar ao vetor pGEM sendo portanto difícil a separação em gel de CsARF e pGEM.

A região de interesse correspondente a CsARF está em destaque em 2,5 kb (figura 23).

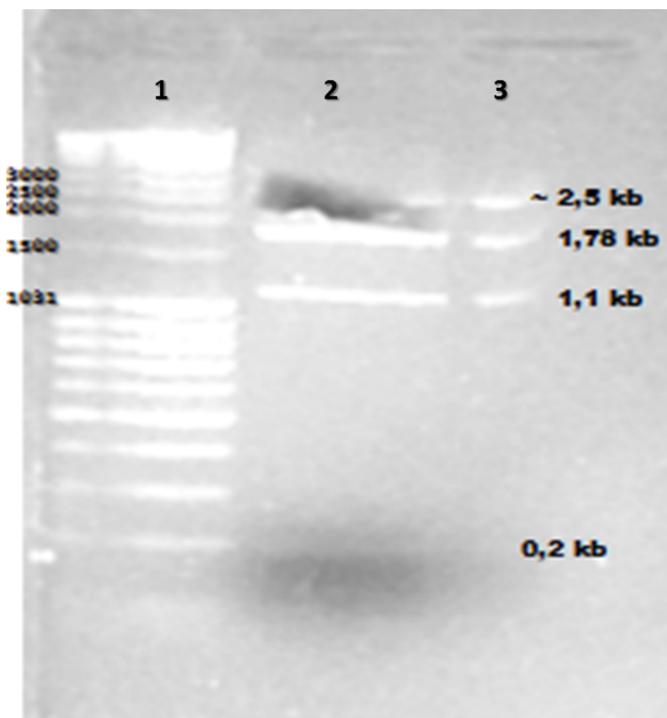


Figura 23 excisão de CsARF : Primeira canaleta marcador “*MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use*”; Segunda canaleta pGEM com CsARF inteiro digerido com as enzimas *SacI*, *NotI* e *PvuI*, houve a liberação de quatro fragmentos e CsARF com 2875 pb aparece em ~2,5 kb, e outros de 1780 pb, 1100 pb e 200 pb.

O pGreen foi digerido com *SacI* e *NotI*, e posteriormente ligado ao CsARF digerido com *SacI* e *NotI*.

PCR de colônia da clonagem de CsARF no vetor pGreen:

Das cinco colônias testadas, as colônias um e três apresentaram amplificação confirmando a clonagem em pGreen. As amostras foram confirmadas por sequenciamento posteriormente.

Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de DNA na reação de PCR nas colônias testadas:

ARFRNAiF 5'-TCTAGACTCGAGAACTGGGTGCCACCAGGG-3'

ARFRNAiR 5'CCAGCCTTCTCAGACCCACACTGGTACCATCGAT3'

Os oligonucleotídeos foram desenhados na região do CsARF fora dos domínios funcionais. O fragmento amplificado ~600 pb (figura 24).

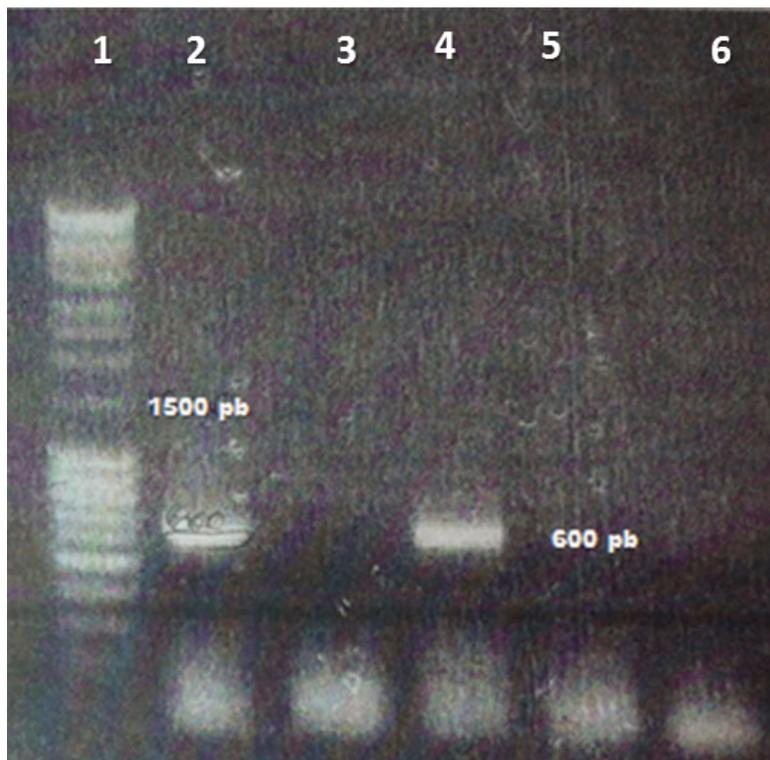


Figura 24 PCR de colônia: Primeira canaleta: marcador *MassRuler DNA Ladder Mix*; Segunda canaleta: pGreen-CsARF com amplificação da região de DNA esperada por PCR confirmação de clonagem no clone; terceira canaleta: pGreen com clonagem não confirmada por PCR não houve amplificação da região esperada indicativa de CsARF; quarta canaleta: pGreen-CsARF com amplificação da região de DNA esperada por PCR confirmação de clonagem no clone; quinta canaleta: pGreen com clonagem não confirmada por PCR não houve amplificação da região esperada indicativa de CsARF; sexta canaleta: pGreen com clonagem não confirmada por PCR não houve amplificação da região esperada indicativa de CsARF.

5.4 Ensaios colorimétricos de atividade da β -glucuronidase em epicótilos de laranja doce

Uma possível região no DNA foi encontrada no trabalho de Souza (2010), a região 5' a montante do gene *CsEXP* de *C. sinensis* que foi clonada, testada e demonstrou neste trabalho em questão ser de fato o promotor mínimo do gene e foi também responsiva à auxina atuando como elemento regulatório de auxina, esta região possui sítios de interação tanto para a proteína PthA como para a proteína CsARF (*AuxRE-like*), sendo portanto uma região de provável co-interação para estas proteínas.

A figura 25 apresenta a regulação normal que deve ocorrer na região promotora mínima por auxina de acordo com Perrot (2010). Uma possibilidade de ação nesta mesma via pela proteína PthA é mostrada na figura 26. Neste caso PthA age em substituição de auxina promovendo diretamente a ativação da transcrição de expansina.

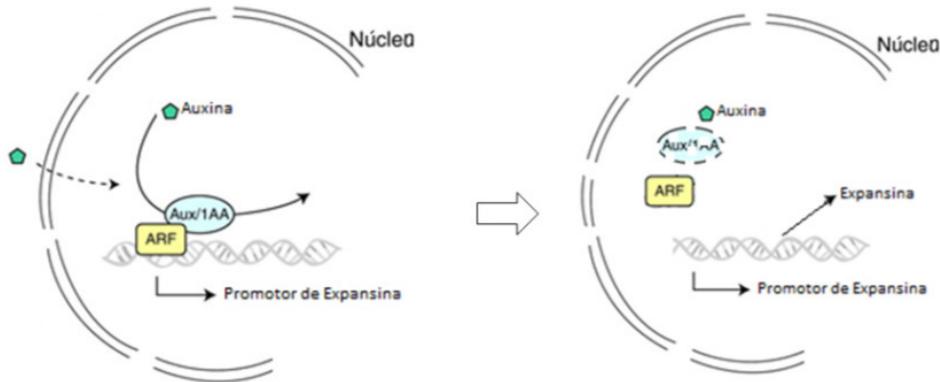


Figura 25: A auxina desitegra Aux/IAA uma proteína repressora, sendo então promovida a transcrição. O ARF em questão está agindo como repressor neste esquema.

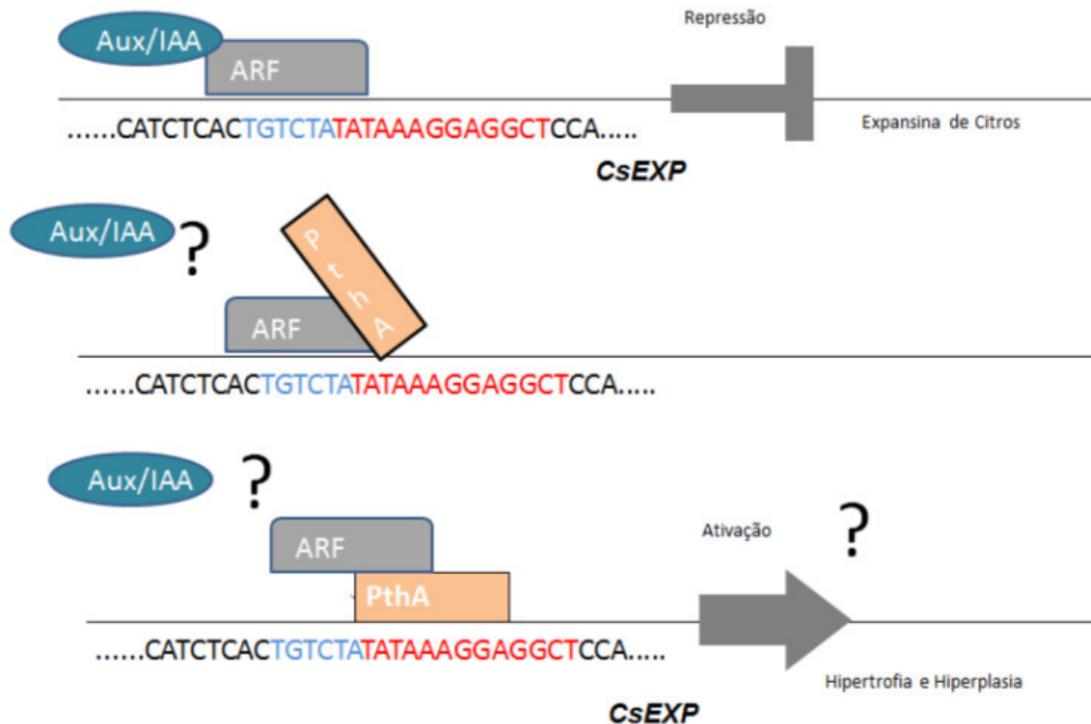


Figura 26: O esquema apresenta PthA interagindo diretamente com CsARF promovendo a ativação da via, como uma possibilidade de ação da proteína PthA. Supondo-se que CsARF seja um repressor da via.

Os epicótilos de laranja doce foram transformados com a construção pCambia3301 ligada ao promotor mínimo CsEXP dirigindo o gene repórter GUS e foram testados em ensaio colorimétrico afim de testar se CsEXP possui atividade promotora. A β -glucuronidase hidrolisa X-gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucuronico, sal cicloexilamonio) a um composto intermediário indoxil que é solúvel em água, este composto se dimeriza em um precipitado azul (dicloro-dibromo-indigo) por uma reação de oxidação. Desta forma é possível saber se há atividade de β -glucuronidase no tecido transformado indicando se há atividade de promotor gênico na região de DNA testada. O vetor pBI vazio contém o gene da β -glucuronidase sob controle do promotor 35S CaMV (35S-GUS), sendo assim, o pBI vazio foi utilizado neste experimento como controle positivo de produção *in vivo* de β -glucuronidase pois o promotor 35S apresenta atividade *in vivo* e está dirigindo GUS e, conseqüentemente, a produção de β -glucuronidase pelo vetor vazio.



Figura 27: Epicótilos de laranja doce transformados transientemente para o ensaio colorimétrico de atividade da β -glucuronidase. Imagem superior: vista geral. Imagem inferior: obtidas com o aumento através do auxílio de uma lupa Nikon SMZ 1500 com um aumento de 11,25 vezes.

A construção 35S-GUS apresenta coloração azul indicado atividade do promotor; CsEXP-GUS não apresenta mudança na coloração indicando que não houve atividade

promotora; CsEXP-GUS + 2,4D: não apresenta mudança na coloração indicando que não houve atividade promotora; CsEXP-GUS + 35S-PthA2: não apresenta mudança na coloração indicando que não houve atividade promotora. A transformação transiente foi realizada em uma duração de 48 horas de incubação.

A figura 27 mostra que não foi possível ver atividade do gene GUS e que, portanto a região CsEXP mínima que foi clonada não apresentou atividade promotora neste experimento de transformação de epicótilos de laranja doce.

5.5 Teste de fluorescência para medição da ativação da expressão de GUS em epicótilos de laranja doce

Epicótilos de laranja doce transformados com a construção pCambia3301 ligada ao promotor mínimo CsEXP, dirigindo o gene repórter GUS (CsEXP-GUS), foram testadas em ensaio fluorogênico realizado com tampão de extração 1mM 4-metilumbeliferil- β -D-glicosídeo (MUG) em incubação por seis horas (descrito no item 5.16 de procedimento experimental) de acordo com Jefferson (1987). A β -glucuronidase é capaz de hidrolisar MUG em um composto fluorescente 4-“methylumbilliferone” (MU), sendo assim quando há a formação de β -glucuronidase (indicando atividade promotora da região de DNA testada) é possível então mensurar a β -glucuronidase formada por ensaio fluorogênico com o composto MUG (figura 28). A quantidade de proteínas totais foi aferida através do “*Kit BCA Pierce- Thermo Scientific*” (descrito no item 5.17).

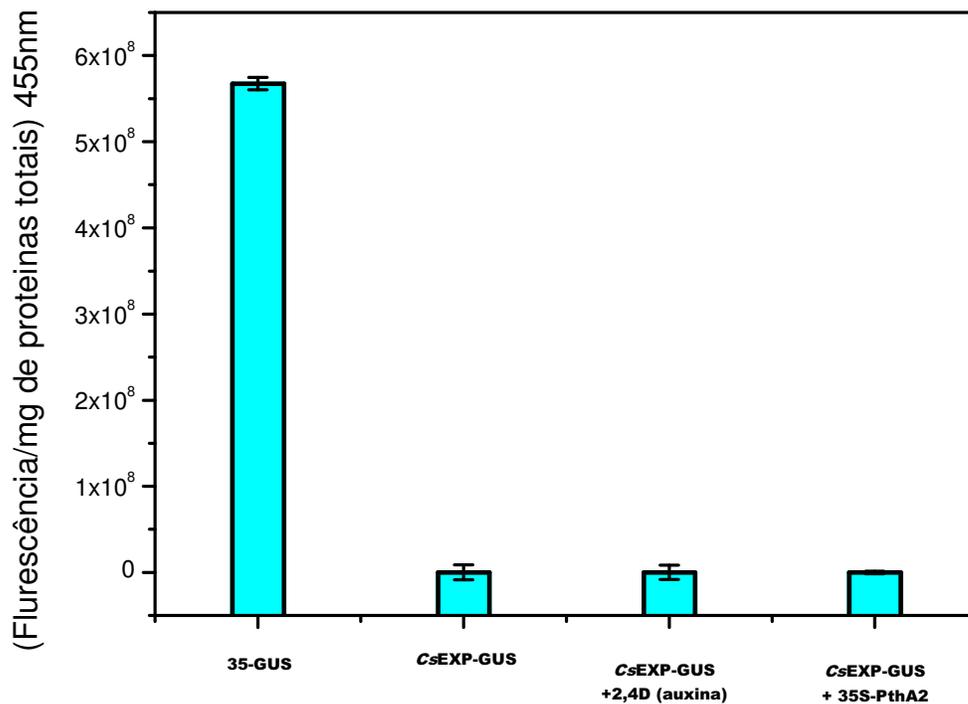


Figura 28: Fluorescência após 6 horas de incubação com o reagente “MUG” por mg de proteínas totais em relação ao controle positivo (pBI: 35S-GUS). Primeira coluna: controle positivo, com o promotor 35S dirigindo a expressão do gene GUS (que produz β -glucuronidase), houve um alto sinal de fluorescência indicando que houve muita produção de β -glucuronidase. Segunda coluna: CsEXP dirigindo a expressão do gene GUS. Não houve muita fluorescência indicando que não há muita formação de β -glucuronidase. Terceira coluna: CsEXP dirigindo a expressão do gene GUS na presença de auxina 2,4D. Não houve muita fluorescência indicando que não há muita formação de β -glucuronidase. Quarta coluna: CsEXP dirigindo a expressão do gene GUS, sob co-transformação com a construção 35S-PthA2(o promotor 35S dirigindo a expressão de PthA2). Não houve muita fluorescência indicando que não há muita formação de β -glucuronidase.

Este ensaio teve o objetivo de testar se promotor mínimo do gene da expansina CsEXP é regulado por auxina e ou PthA2 e se realmente apresentava atividade promotora. Os epicótilos de laranja doce foram transformados com as seguintes construções: CsEXP-GUS; CsEXP-GUS + 35S-PthA2; CsEXP-GUS + auxina 2,4D. Foi demonstrada uma correlação entre o ensaio colorimétrico e o ensaio fluorimétrico, sendo que não houve uma ativação do gene dirigida por CsEXP neste experimento. Os resultados demonstraram que

a região testada não possuía a atividade como promotora genica, pois não foi capaz de induzir a produção de β -glucuronidase.

No ensaio colorimétrico de atividade da β -glucuronidase em epicótilos de laranja doce é evidente a diferença na coloração entre o controle positivo pBI vazio (35S-GUS) em relação aos epicótilos transformados com CsEXP. Assim como no ensaio de fluorescência não houve atividade de β -glucuronidase. O CsEXP não foi capaz de ativar o gene GUS, na presença da auxina 2,4D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) na transformação transiente em epicótilos de laranja doce, por este motivo o hormônio auxina 2,4 D foi trocado por auxina ANA (ácido naftaleno-acético), pois já havia sido utilizado em trabalhos anteriores (CERNADAS, 2009). Optou-se por trocar de organismo para este experimento de atividade de β -glucuronidase, o organismo optado foi o tabaco, pois se trata de um organismo comumente utilizado em transformação transiente com *Agrobacterium tumefaciens*.

As auxinas são hormônios que promovem distensão celular no vegetal sendo responsáveis pelo crescimento do tecido, além de possuírem outras atividades nas plantas. Existem diversos tipos de auxina sendo divididas em naturais e sintéticas. Destaca-se como auxina natural o ácido indol-3-acético (AIA) como auxina mais importante em plantas. Das auxinas em questão nesta dissertação 2,4 D é uma auxina que possui efeito herbicida e é comumente utilizada nos protocolos de transformação de tecidos de plantas. A auxina ANA é um análogo de AIA e é uma auxina sintética muito utilizada para promover crescimento em plantas. A auxina 2,4D apresenta problemas na cadeia de transporte de auxina (BENKOVA, 2003).

A auxina 2,4D foi utilizada neste trabalho por seu comum uso em transformação de plantas. Dentre as auxinas existentes ANA foi escolhida empiricamente, pois trabalhos anteriores do grupo já haviam utilizado ANA com resultados positivos nesta utilização como foi relatado por Cernadas em 2008, ANA ativou o gene de expansina.

5.6 Transformação transiente em folhas de tabaco: incubação por 48 horas e por 72 horas

O tabaco foi o organismo utilizado então, por ser comumente citado na literatura, para a transformação com as mesmas construções (construção com a região promotora

mínima de CsEXP dirigindo o gene GUS na ausência de auxina e na presença de auxina ANA. As construções pthA2-pBI (35S-PthA2) e pthA4-pBI(35S-PthA4) previamente existentes no grupo (PEREIRA, 2011) e por último o vetor pBI vazio com o promotor 35S dirigindo a expressão do gene GUS. As folhas de tabaco foram infiltradas com solução de *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) contendo as construções já referidas na presença ou ausência de ANA por um período de 48 horas e 72 horas (figuras 29 e 30).

Transformação transiente de tabaco por 48 horas:

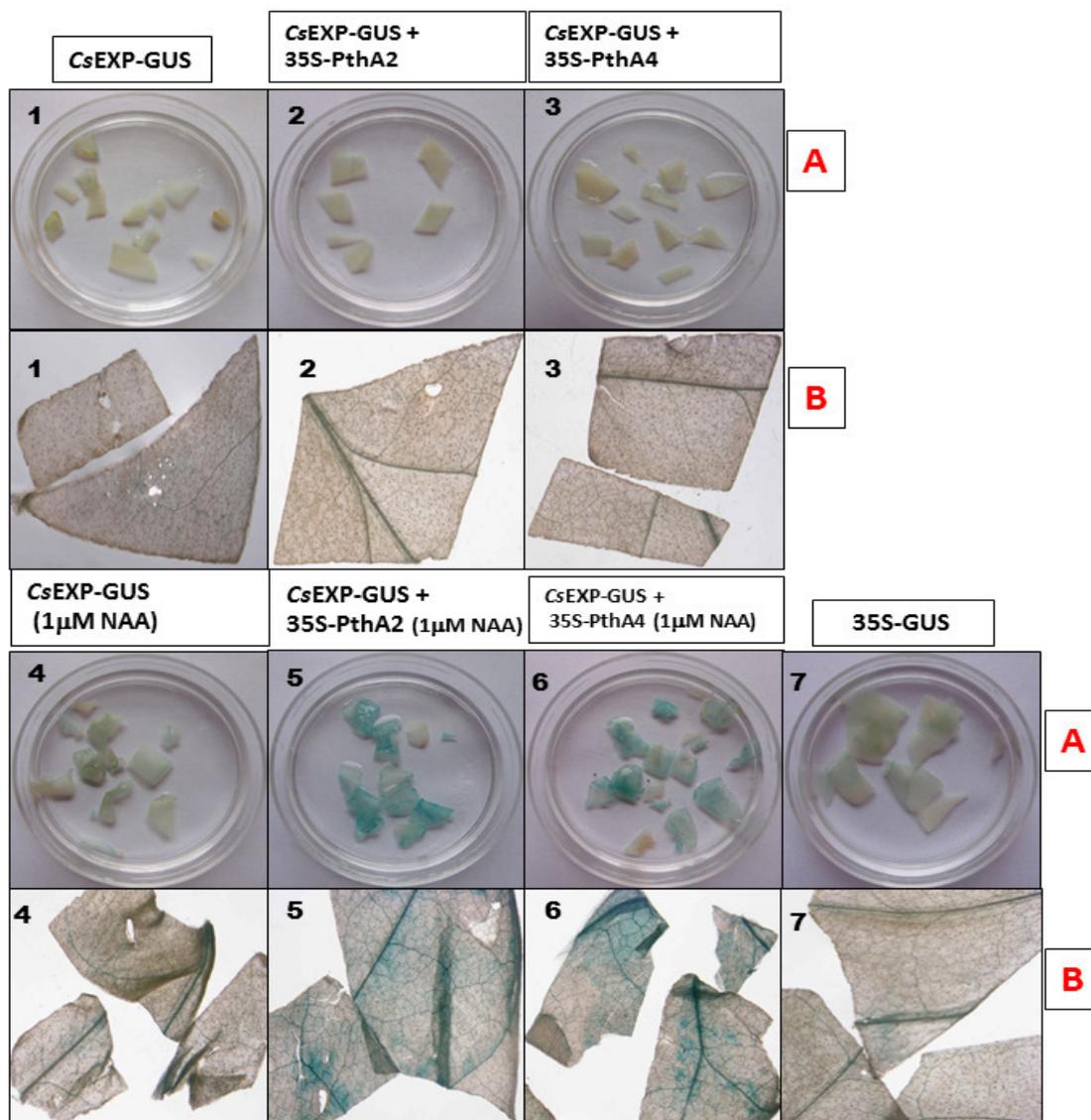


Figura 29: Folhas de tabaco transformadas transientemente para o ensaio colorimétrico de atividade da β -glucuronidase em incubação por 48 horas. Imagem superior A: vista geral. Imagem inferior B: obtidas com o aumento através de uma lupa Nikon SMZ 1500 com um aumento de 11,25 vezes. Imagem 1: A construção com a região promotora mínima de CsEXP dirigindo o gene GUS na ausência de auxina : CsEXP-GUS; Imagem 2: A construção CsEXP-GUS transformada conjuntamente com a construção pthA2-pBI (35S-PthA2); Imagem 3: A construção CsEXP-GUS transformada conjuntamente com a construção pthA4-pBI (35S-PthA4); Imagem 4: CsEXP-GUS na presença de 1 μ M de ANA; Imagem 5: CsEXP-GUS na presença de 1 μ M de ANA transformado conjuntamente com a construção pthA2-pBI (35S-PthA2); Imagem 6: CsEXP-GUS na presença de 1 μ M de ANA transformado conjuntamente com a construção pthA4-pBI (35S-PthA4); Imagem 7: O vetor pBI vazio com o promotor 35S dirigindo a expressão do gene GUS (35S-GUS).

Transformação transiente de tabaco por 72 horas:

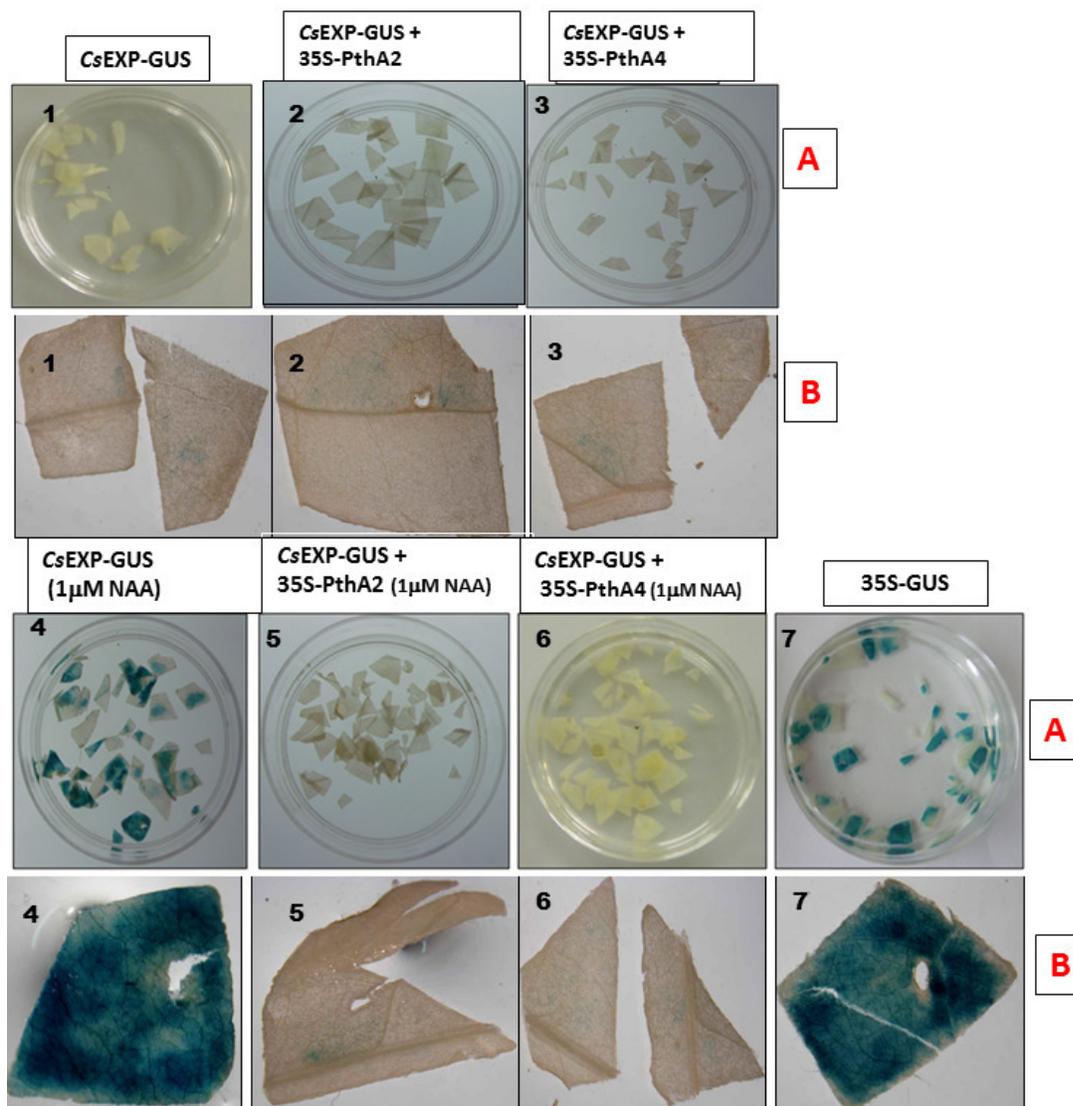


Figura 30: Folhas de tabaco transformadas transientemente para o ensaio colorimétrico de atividade da β -glucuronidase em incubação por 72 horas. Imagem superior A: vista geral. Imagem inferior B: obtidas com o aumento através de uma lupa Nikon SMZ 1500 com um aumento de 11,25 vezes. Imagem 1: A construção com a região promotora mínima de CsEXP dirigindo o gene GUS na ausência de auxina : CsEXP-GUS; Imagem 2: A construção CsEXP-GUS transformada conjuntamente com a construção pthA2-pBI (35S-PthA2); Imagem 3: A construção CsEXP-GUS transformada conjuntamente com a construção pthA4-pBI (35S-PthA4); Imagem 4: CsEXP-GUS na presença de 1 μ M de ANA; Imagem 5: CsEXP-GUS na presença de 1 μ M de ANA transformado conjuntamente com a construção pthA2-pBI (35S-PthA2); Imagem 6: CsEXP-GUS na presença de 1 μ M de ANA transformado conjuntamente com a construção pthA4-pBI (35S-PthA4); Imagem 7: O vetor pBI vazio com o promotor 35S dirigindo a expressão do gene GUS (35S-GUS).

No ensaio colorimétrico de atividade da β -glucuronidase na expressão transiente do gene GUS através de transformação por infiltração em folhas de tabaco a inoculação de 10 μ M de auxina ANA necrosou o tecido, portanto a dose foi reduzida para 1 μ M de ANA.

Nota-se que a auxina ANA é capaz de ativar a região chamada de promotora mínima de CsEXP em folhas de tabaco fortemente em 72 horas de incubação (figura 30; imagem número 4 em 72 horas de incubação). Sendo que tal ensaio demonstrou a atividade promotora da chamada região promotora mínima de CsEXP. Houve um significativo aumento da expressão do gene GUS quando há a infiltração de PthA2 ou PthA4 junto de auxina na incubação de 48 horas indicando um sinergismo (interação) entre PthA e auxina na expressão do gene GUS dirigida pela região promotora mínima (figura 29; imagens número 5 e 6 em 48 horas de incubação). As proteínas PthA2 ou PthA4 podem ter sido capazes de potencializar a ativação em 48 horas. A infiltração somente de PthA2 ou PthA4 sem auxina não ativou substantivamente o gene GUS no teste colorimétrico de atividade da β -glucuronidase nem em 48 horas de incubação e nem em 72 horas, na transformação em folhas de tabaco (figuras 29 e 30; imagens número 2 e 3 em 48 horas e em 72 horas de incubação).

Foi possível notar que em 72 horas de incubação a transformação de auxina ANA juntamente com PthA2 ou PthA4 perdeu a ativação do gene GUS (figura 30; imagens número 5 e 6 em 72 horas de incubação). Provavelmente houve um esgotamento da atividade da proteína de PthA em 72 horas. A proteína pode ter sido reprimida por “*feedback*” positivo, ou seja, a própria produção de PthA inibiu a produção de PthA. Ainda pode haver a possibilidade de em 72 horas PthA reprimir a via de auxina contrariando a hipótese proposta no trabalho de que PthA ativa a via de auxina (como foi verificado em 48 horas figura 29 imagens 5 e 6) ou ainda há realmente um sinergismo porém há um esgotamento na produção de PthA em 72 horas de incubação.

A atividade sinérgica da proteína PthA juntamente com ANA que promoveu a ativação do gene GUS contrasta com a atividade fortemente ativada somente por ANA em 72 horas, pois era de se esperar um sinergismo ainda maior já que ANA promoveu uma atividade ainda mais de GUS em 72 horas. Porém pode ser que a proteína PthA apenas interage promovendo ativação promotora em 48 horas de atividade de auxina.

5.7 Expressão da proteína CsARF em reticulócitos de coelho

Como não foi possível expressar a proteína CsARF em *E.coli* a alternativa encontrada para expressar a proteína a ser utilizada nos ensaios de gel- “*shift*” foi a utilização da expressão em reticulócitos de coelho utilizando o “*Kit TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems*”(PROMEGA) como descrito no item 5.10.

Na figura 31 pode-se notar que houve a expressão e tradução da proteína de interesse CsARF-Flag (indicado pela flecha em preto). A proteína CsARF foi expressa em reticulócitos com o objetivo de ser usada em experimentos de “*gel-shift*”.

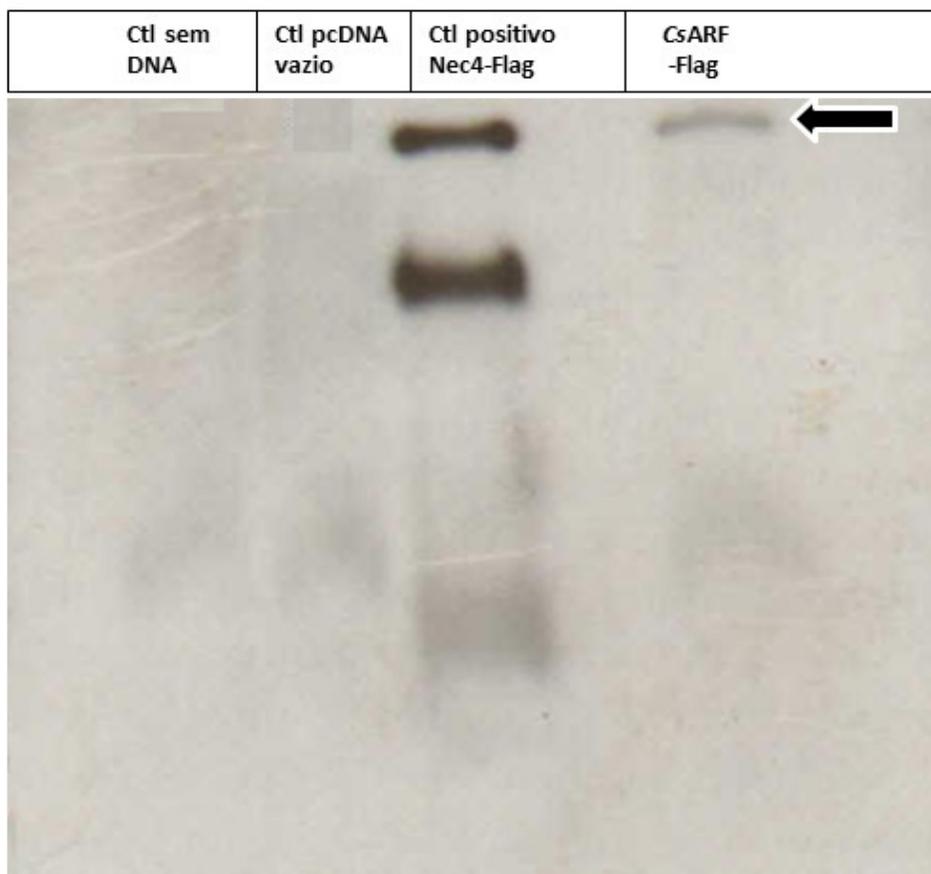


Figura 31: “*Western Blotting*”: Expressão e tradução da proteína CsARF através do kit de reticulócitos. Primeira canaleta: controle na ausência de DNA para expressão; segunda canaleta: o vetor pcDNA cauda “flag” vazio; terceira canaleta: a proteína nec4 cauda “flag” utilizada como controle positivo e ultima canaleta CsARF cauda “Flag”. A seta indica a banca correspondente à proteína CsARF.

5.8 Expressão da proteína PthA2

Na figura 32 é possível ver a banda correspondente à proteína PthA2 indicada com a seta em vermelho (PthA ~116-122 KDa), confirmando portanto a produção da proteína PthA2, que foi utilizada para o ensaio “gel-shift”.

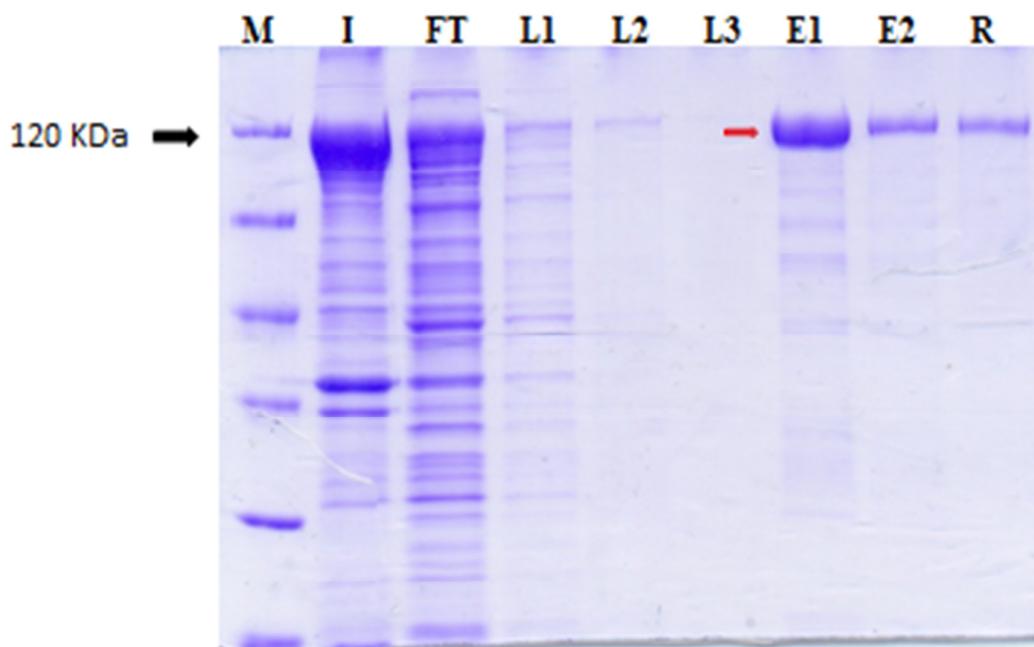


Figura 32: Expressão da proteína PthA2: Marcador: “*Prestained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific)*”. I: Proteína no insolúvel; FT: Primeiro descarte; L1: Primeira lavagem da resina com tampão de imidazol ; L2: Segunda lavagem com tampão de imidazol; L3: Terceira lavagem com tampão de imidazol; E1: Primeira eluição; E2: Segunda eluição; R: Resina aquecida.

Tabela 8 – Sondas utilizadas nos ensaios de EMSA (gel “*shift*”) com CsARF e PthA2

Nome dos Oligonucleotídeos	Sequência 5' 3'
Selvagem “W” (CsEXP)	CCGCATCTCACTGTCTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
MUT1	CCGCATCTCACGGACTATATAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
MUT2	CCGCATCTCACTGTCTACAGAAAGGAGGCTCCATTCCCCCTGC
EXPPthA2 (Selvagem 2)	TCTTTTCTTAACAAAAAACACATAAACATAAGCAGC
PR5-Comp2	TACACATTCTAAAATTTACACACCTCTTTTAATATTTC

5.9 Ensaio gel “shift” para proteína CsARF

A figura 33 apresenta o ensaio entre as sondas de DNA marcadas com radioativos na presença da proteína CsARF.

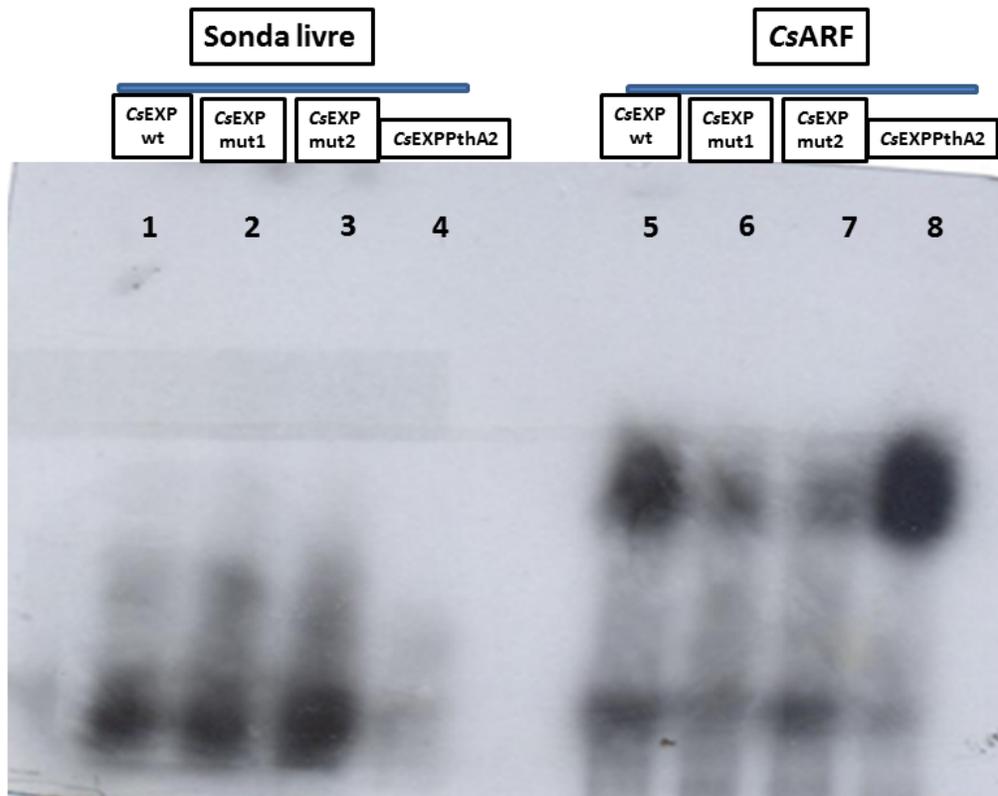


Figura 33: Ensaio gel “shift”. Primeira canaleta: sonda de DNA não mutada, selvagem (s) correspondente ao “box” CsEXP com sitio de ligação para PthA e para CsARF, livre de proteína; segunda canaleta sonda de DNA mutada que não possui a região de interação predita para a proteína CsARF (Mut1), livre de proteína; terceira canaleta: sonda de DNA mutada que não possui a região de interação predita para a proteína PthA (Mut2) livre de proteína; quarta canaleta: nova sonda que apresenta sitio de ligação para PthA, uma região para provável substituição do “box” CsEXP chamada de região selvagem 2 (S2); quinta canaleta: sonda não mutada (S) na presença da proteína CsARF; sexta canaleta: sonda mutante 1 (Mut1) na presença da proteína CsARF; sétima canaleta: sonda mutante 2 (Mut2) na presença da proteína CsARF; oitava canaleta: nova sonda que apresenta sitio de ligação para PthA, uma região para provável para ligação no “box” CsEXP chamada de região selvagem 2 (S2) na presença da proteína CsARF.

A figura 33 mostra que houve um enfraquecimento da ligação da proteína nas sondas mutantes, e também que o novo “box” encontrado com a sequência ACACATAAACATAAGC, que é similar a sequência predita para a ligação à proteína PthA2 apresentado neste trabalho, apresenta uma afinidade maior à proteína CsARF o que

contrasta com dados da literatura dado que esta sonda não possui o “box” AuxRE. Era esperado que CsARF perdesse a afinidade somente pela sonda mutante 1 que não possui a região de ligação TGTCTA, porém ele perdeu a afinidade pelas duas sondas mutantes e se ligou a sonda não mutada, o que era esperado, além do mais apresentou uma maior afinidade pela sonda nova que apenas foi desenhada por apresentar similaridade para ligação para a proteína PthA e mais incomum ainda é o fato de tal sonda não possuir o “box” de ligação TGTCTC (ou GAGACA) que consiste no AuxRE “box” para a ligação de CsARF (ULMASOV, 1995), sendo assim o resultado contrasta com dados da literatura.

5.10 Ensaio gel “shift” com a proteína PthA2

Foi demonstrado que a família de proteínas AvrBs3/PthA pode se ligar com certa especificidade a uma região consenso localizado no TATA-box (KAY, 2007). Devido ao fato da proteína efetora PthA ser da mesma família, propôs-se neste trabalho que, da mesma forma que as proteínas PthAs, teriam a mesma afinidade pelo componente TATA-box. Porém, trabalhos recentes demonstram que as proteínas efetoras tem uma especificidade previsível de ligação ao DNA de acordo com o seu domínio central de repetições (BOCH, 2009). De acordo com o trabalho de Boch (2009), Pereira (2011) desenhou sondas preditas para ligação com cada proteína PthA (variantes 1-4), a sonda Comp2 predita para a ligação com a proteína PthA2 foi utilizada neste trabalho. Foram realizados experimentos tanto com sondas com o componente TATA-box como com a sonda predita de acordo com o posposto por Boch (2009) (figura 34).

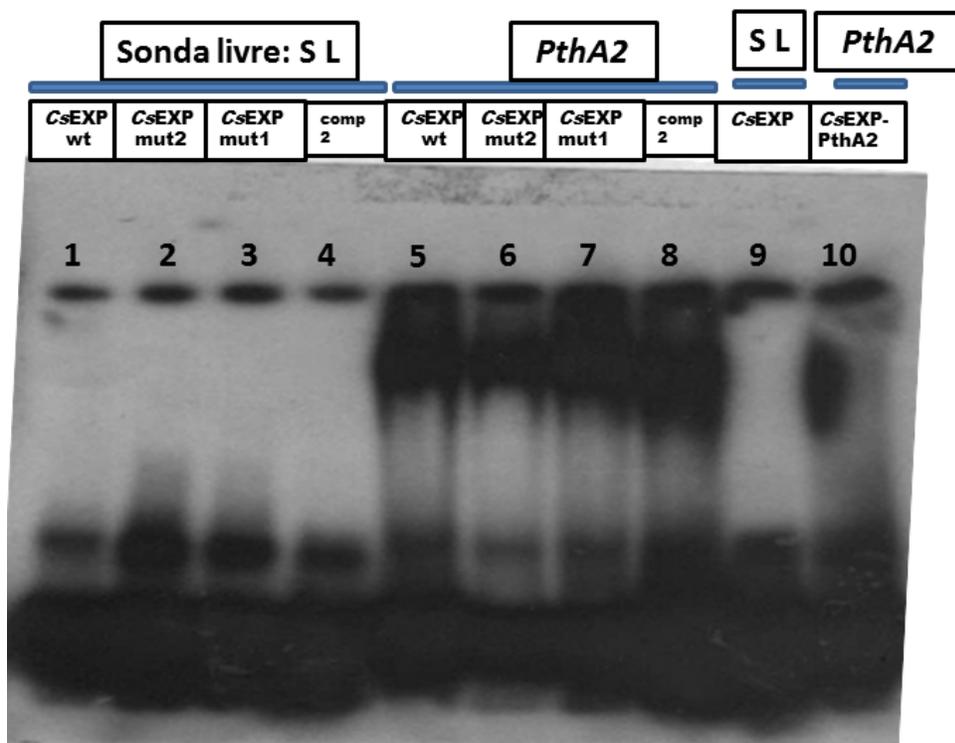


Figura 34: Ensaio gel “shift”. Primeira canaleta: sonda de DNA não mutada, selvagem (CsEXP wt) correspondente ao “box” CsEXP com sitio de ligação TATAbox para PthA e para CsARF, livre de proteína; segunda canaleta: sonda de DNA mutada que não possui a região de interação predita para a proteína PthA (CsEXP Mut2) livre de proteína; terceira canaleta: sonda de DNA mutada que não possui a região de interação predita para a proteína CsARF (CsEXP Mut1) livre de proteína; quarta canaleta: sonda PR5-Comp2 a sonda predita para PthA2 livre de proteína; quinta canaleta: sonda de DNA não mutada, selvagem (CsEXP wt) correspondente ao “box” CsEXP com sitio de ligação TATAbox para PthA e para CsARF na presença da proteína PthA2; sexta canaleta: sonda de DNA mutada que não possui a região de interação predita para a proteína PthA (CsEXP Mut2) na presença da proteína PthA2; sétima canaleta: sonda de DNA mutada que não possui a região de interação predita para a proteína CsARF (CsEXP Mut1) na presença da proteína PthA2; oitava canaleta: sonda PR5-Comp2 a sonda predita para PthA2 na presença da proteína PthA2; nona canaleta: nova sonda que apresenta sitio de ligação para PthA, uma região selvagem 2 (CsEXPPthA2) livre de proteína; décima canaleta: nova sonda que apresenta sitio de ligação para PthA, uma região selvagem 2 (CsEXPPthA2) na presença da proteína PthA2. Flecha em vermelho indica amostra que ficou presa no “pocinho” do gel.

A proteína PthA2 se ligou a todas as construções de sondas mutantes ou não (figura 34), e houve uma ligação um pouco menor as sondas (Mut2) e (CsEXPPthA2), tais bandas apresentaram-se um pouco mais fracas.

5.11 Ensaio gel “shift” de competição do “box” CsEXP contra a sonda predita PR5-Comp2

Este experimento (figura 35) foi realizado com a sonda CsEXP (S) marcada com radioativo na presença da proteína PthA2, sempre na mesma concentração, para ligação com a sonda. A sonda PR5-Comp2 que possui a sequência predita para ligação ao PthA2, não foi marcada com radioativo, e foi colocada como competidora contra a sonda CsEXP (S) marcada com o radioativo. À medida que a sonda PR5-Comp2 se liga à proteína PthA2 a banda com a marcação de radioativo desaparece indicando que a sonda marcada está perdendo a competição pela proteína para a sonda não marcada.

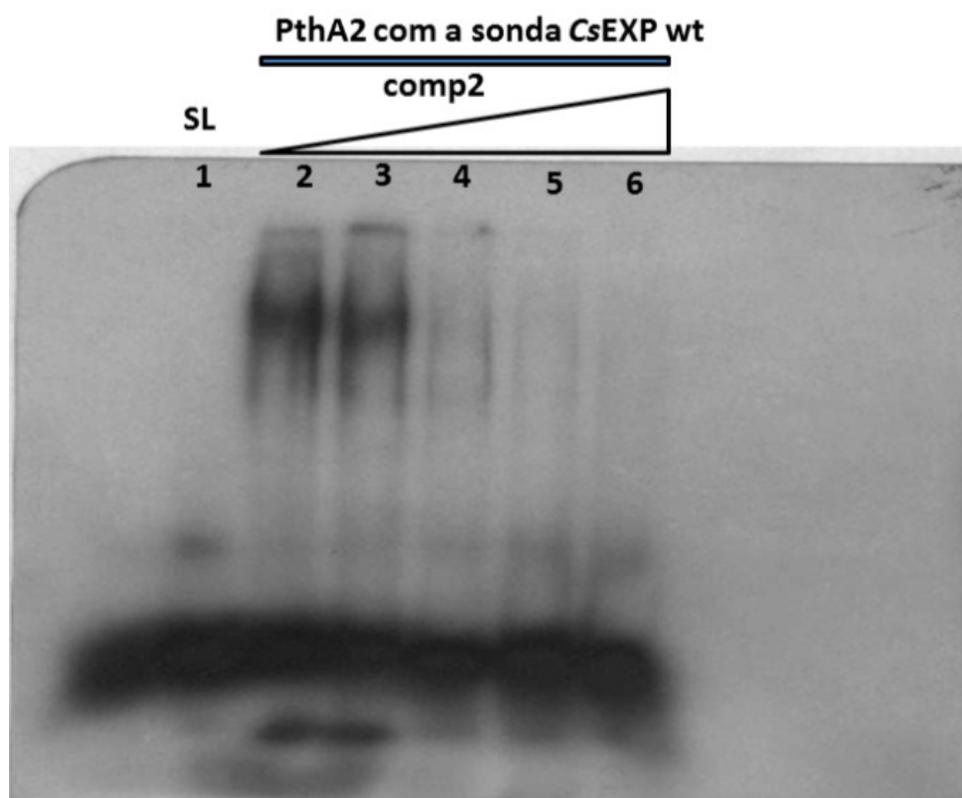


Figura 35: Ensaio gel “shift” de competição. Primeira canaleta: sonda de DNA não mutada, selvagem (s) correspondente ao “box” CsEXP com sitio de ligação para PthA e para CsARF, livre de proteína; segunda canaleta: sonda CsEXP na presença da proteína PthA2; terceira canaleta: sonda CsEXP 1:1 sonda PR5-Comp2 fria na presença da proteína PthA2; quarta canaleta: sonda CsEXP 1:10 sonda PR5-Comp2 fria na presença da proteína PthA2; quinta canaleta: sonda CsEXP 1: 50 sonda PR5-Comp2 fria na presença da proteína PthA2; sexta canaleta: sonda CsEXP 1:100 sonda PR5-Comp2 fria na presença da proteína PthA2.

A sonda com a composição predita PR5-Comp2 a partir de uma concentração dez vezes maior que a sonda CsEXP ganha a competição na ligação com a proteína PthA2. Existe uma dificuldade neste caso pelo fato de o radioativo estar com uma marcação fraca. PthA na concentração 1: 1 de sondas competidoras se ligou a sonda CsEXP wt com o componente TATA-*box*.

6 Análise dos resultados para o ensaio gel “shift”

Estes resultados precisam de repetições para confirmação, porém se pode inferir que houve ligação da proteína PthA2 a todas as construções de sondas testadas, e que a proteína CsARF se ligou mais fortemente as sondas selvagens do que a sondas mutantes. Além disto, no caso da competição nas concentrações de 1:1 entre a sonda com o componente TATA-*box* (sonda CsEXP wt) e a sonda PR5-Comp2 predita a sonda predita nesta concentração não foi capaz de ganhar a competição pela proteína.

Em uma análise geral nota-se que tanto a sequência predita como a sequência com o TATA-*box* se ligam à proteína PthA2.

Foram realizados ensaio de gel “*shift*” para analisar se as proteínas em questão se ligavam a região CsEXP, e constatou-se que houve ligação das proteínas nestas sequências de DNA, o que corrobora com a hipótese apresentada neste trabalho. A região que foi apontada como um promotor mínimo foi analisada no ensaio colorimétrico de atividade da β -glucuronidase *in vivo* tal região é responsiva à auxina, pois foi capaz de causar atividade da β -glucuronidase (gene repórter).

A auxina é necessária para a instauração da doença como foi visto em trabalhos anteriores, além disso, neste trabalho foi notado haver um sinergismo (interação) entre a proteína PthA2 e/ou PthA4 com auxina na regulação do hormônio (foi verificado um aumento da transcrição na presença de PthA em 48 horas), portanto, essa região do DNA torna-se um importante alvo de estudo de interações prováveis correlacionados com o desenvolvimento da doença.

7 Dificuldades e soluções

Houve uma dificuldade experimental no procedimento de transformação transiente de epicótilos de laranja doce. A solução mais adequada foi alterar alguns procedimentos no protocolo utilizado, no sentido de identificar a melhor condição para a realização do experimento em questão. O tabaco foi então um modelo escolhido, por ser uma planta que possui facilidade para transformação genética e é uma planta modelo muito utilizada e citada na literatura. Não foi possível ver efeito com a auxina 2,4D utilizada primeiramente motivo pelo qual tal auxina foi modificada, e usou-se ANA (auxina) inclusive porque como relatado em Cernadas (2008), ANA ativou o gene de expansina.

8 Conclusão

Os resultados corroboraram com a hipótese de que a região 5' a montante do gene *Csexp* de *C. sinensis* representa de fato o promotor mínimo do gene. Sugere também que o “*box AuxRE-like*” funciona como elemento regulatório de resposta à auxina, pois os ensaios *in vivo* confirmaram a ativação do gene repórter por auxina, indicando que, neste caso a, auxina tem papel regulador positivo. Além disso, PthA2 e PthA4, individualmente somados à auxina, levaram ao aumento da atividade do gene repórter em 48 horas, sugerindo assim, que estas variantes de PthA atuam de forma sinérgica com auxina, potencializando a atividade do promotor em estudo. Contudo, os experimentos precisam ser repetidos para melhor elucidação do papel da proteína efetora em relação a interação com o promotor mínimo. O ensaio “*gel-Shift*” mostrou que *CsARF* possui uma maior afinidade pela região não mutada, corroborando assim com a hipótese de que o sítio de ligação proposto pode ser o sítio de ligação dessa proteína ao DNA. A proteína PthA2 também possui afinidade por esta região, como foi mostrado nos resultados dos experimentos de gel “*shift*”. Como foi verificado neste trabalho essa região do DNA torna-se um importante alvo de estudo de interações prováveis correlacionados com o desenvolvimento da doença.

9 Perspectivas

Apesar de todas as clonagens para a super-expressão de *CsARF* terem sido realizadas e o experimento de transformação transiente de super-expressão de *CsARF* em epicótilos de laranja doce também ter sido realizado, a análise de micro arranjos final

não pode ser concluída, o que impediu saber se CsARF se tratava mesmo de um repressor da via de auxina. É necessário, portanto fazer a super- expressão de CsARF e posterior análise da expressão diferencial gênica por microarranjos.

10 Bibliografia

AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Comunicado técnico, 2003. ISSN 0102-0099 Brasília, DF.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS EXPORTADORES DE SUCOS CÍTRICOS. Disponível em: <http://www.citrus.com/>. Acesso em: 21 dez. 2011.

BARBOSA-MENDES, J. M.; MOURÃO-FILHO, A. A. F.; BERGAMIN-FILHO, A.; HARAKAVA, R.; BEER, V. S.; MENDES, B. M. J. Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with hrpN gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the Ntransgenic lines for resistance to citrus canker. *Scientia Horticulturae*, 2009. 122: 109–115.

BEHLAU, F.; BELASQUE-JR., J.; BERGAMIN-FILHO, A.; GRAHAM, J.H.; LEITE, JR, R.P.; GOTTWALD, T.R. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. *Crop Protection*, 2008. 27: 807–813.

BEHLAU, F.; BELASQUE-JR., J.; GRAHAM, J.H.; LEITE JR, R.P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. *Crop Protection*, 2010. 29: 300–305.

BELASQUE JR., J.; FERNANDES, N. G.; CÍCERO AUGUSTO MASSARI, C. A. O Sucesso da Campanha de Erradicação do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo, Brasil /The Success of eradication campaign os Citrus Canker in São Paulo States, Brazil. *Summa Phytopathol.*, 2009 . 35: 91-92.

BELASQUE JR., J.; PARRA, A.L.; CHAGAS, M.C.M.; BEHE, C.; AYRES, A.J.; PARRA, J.R.P.; HARTUNG, J.S. Interaction of citrus bacterial canker, citrus leaf miner and pest management. *Phytopathology*, 2001. 91: S7.

BEVERIDGE, C.A., DUN, E.A., AND RAMEAU, C. Pea has its tendrils in branching discoveries spanning a century from auxin to strigolactones. *Plant Physiol*, 2009. 151: 985–990.

BENKOVA , E.; MICHNIEWICZ, M.; SAUER, M.; TEICHMANN, T.; SEIFERTOVA , D.; JÜRGENS, G.; FRIML, J. Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell*, 2003.115: 591–602.

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

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 2003. 3: 141–157.

BUTTNER D.; BONAS U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. *FEMS Microbiol Rev*, 2010. 34: 107–133.

CARDOSO, S. C.; BARBOSA-MENDES, J. M.; BOSCARIOL-CAMARGO L. R.; CHRISTIANO, R. S. C.; BERGAMIN-FILHO, A.; CARNEIRO VIEIRA M. L. C.; MENDES, B. M. J.; MOURÃO-FILHO, A. A. F. Transgenic Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Expressing the attacin A Gene for Resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Mol Biol Rep*, 2010. 28: 185–192.

CERNADAS, R.A.; BENEDETTI C.E. Role of auxin and gibberellin in citrus canker development and in the transcriptional control of cell-wall remodeling genes modulated by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Plant Science*, 2009. 177: 190–195.

CERNADAS, R. A.; CAMILLO, L. R.; BENEDETTI, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Molecular Plant Pathology*, 2008. 9 (5) : 609–631.

COLE, M.; CHANDLER¹, J.; WEIJERS, D.; JACOBS, B.; COMELLI, P.; WERR, W. DORNSCHEN is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the *Arabidopsis embryo*. *Development*, 2009. 136: 1643-1651.

DIÁRIO OFICIAL, 1999. Disponível em:
<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislações/popup.phd?action=view&idleg=410>). Acesso em:
Nov. 2012.

DING, X.; CAO, Y.; HUANG, L.; ZHAO, J.; XU, C.; LI, X.; WANG, S. Activation of the Indole-3-Acetic Acid–Amido Synthetase GH3-8 Suppresses Expansin Expression and Promotes Salicylate- and Jasmonate-Independent Basal Immunity in Rice. *The Plant Cell*, 2008. 20: 228–240.

DOMINGO, C.; ANDRES, F.; THARREAU, D.; IGLESIAS, J.D.; TALON, M. Constitutive expression of OsGH3.1 reduces auxin content and enhances defense response and resistance to a fungal pathogen in rice, *Mol. Plant Microbe Interact*, 2009. 22: 201–210.

DOMINGUES, M. N.; SOUZA, T. A.; CERNADAS, R. A.; OLIVEIRA, M. L. P. O.; DOCENA, C.; FARAH, C. S.; BENEDETTI, C. E. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. *Molecular Plant Pathology*, 2010. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2010.00636.X.

DUAN, Y.P.; CASTAÑEDA, A.; ZHAO, G.; ERDOS, G.; GABRIEL, D.W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol Plant-Microbe Interact*, 1999. 12 (6): 556-560.

ELLIS, C. M.; NAGPAL, P.; YOUNG, J. C.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J.; REED, J. W. Auxin Response Factor1 and Auxin Response Factor2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Company of Biologists*, 2005. doi:10.1242/dev.02012.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; SCHMELZER, E.; HAHLBROCK, K.; Somssich, I. E. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *The EMBO Journal*, 1999. 18 (17):4689-4699.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em: jan. 2013.

FRANCIS, M. I.; REDONDO, A.; BURNS, J. K.; GRAHAM, J. H. Soil application of imidacloprid and related SAR-inducing compounds produces effective and persistent control of citrus canker. *Eur J Plant Pathol*, 2009. 124: 283–292.

FUJIKAWA, T.; ISHIHARA H.; LEACH, J. E.; TSUYUMU, S. Suppression of Defense Response in Plants by the avrBs3/pthA Gene Family of *Xanthomonas* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006. Vol. 19, No. 3: 342–349.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (Fundecitrus). Disponível em: Fundecitros:<http://www.fundecitrus.com.br/Noticias/07.02.11---Incidencia-de-cancro-citrico-cresce-no-Estado-de-Sao-Paulo,166>). Acesso em: dez. 2012.

GARAVAGLIA, B. S.; THOMAS, L.; GOTTIG, N.; DUNGER, G.; GAROFALO, C. G.; DAURELIO, L. D.; NDIMBA, B.; ORELLANO, G. E.; GEHRING, C.; OTTADO, J. A. Eukaryotic-Acquired Gene by a Biotrophic Phytopathogen Allows Prolonged Survival on the Host by Counteracting the Shut-Down of Plant Photosynthesis. *journal.pone.0008950*. PLoS ONE, 2010. 5(1): 8950.

GÓMEZ-GÓMEZ, L. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol Immunol*, 2004. 41: 1055-62.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; DAURELIO, L. D.; VALENTINE, A.; GEHRING, C.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. Modulating host homeostasis as a strategy in the plant-pathogen arms Race. *Communicative & Integrative Biology*, 2009.2: (2) 89-90.(b).

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. A. Filamentous Hemagglutinin-Like Protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the Phytopathogen Responsible for Citrus Canker, Is Involved in Bacterial Virulence. *journal.pone.0004358* PLoS ONE, 2009. 4(2): 4358.(a).

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: The pathogen and its impact. Online. *Plant Health Progress*, 2002. doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

HAGER, A. Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin induced elongation growth: Historical and new aspects. *J. Plant Res.*, 2003.116: 483–505.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidência/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2233&id_pagina=1). Acesso em: janeiro 2013.

JAIN, M.; KAUR, N.; GARG, R.; THAKUR, J.K.; TYAGI, A.K. Khurana, J.P. Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct. Integr. Genomics*, 2006. 6:47-59.

JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A.; BEVAN, M.W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987. 6:3901-3907.

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. *Nature*, 2006. 444, 323-9.

KAY, S.; HAHN, S.; MAROIS, E.; HAUSE, G.; BONAS, U. A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science*, 2007. 318: 648.

KAY, S.; HAHN, S.; MAROIS, E.; WIEDUWILD, R.; BONAS, U. Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Drep16. *The Plant Journal*, 2009. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03922.x.

KEPINKI, S.; LEYSER, O. Auxin-induced SCFTIR1–Aux_IAA interaction involves stable modification of the SCFTIR1 complex. *PNAS*, 2004. (101) 33:12381–12386.

KHALAF, A.; GMITTER, F.; CONESA, A.; DOPAZO, J.; MOORE, G.A. *Fortunella margarita* Transcriptional Reprogramming Triggered by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *BMC Plant Biol*, 2011; 11: 159.

LI, Y.; JONES, L.; MASON, M. Expansins and cell growth *Current Opinion in Plant Biology*, 2003.6:603–610.

LIM, P. O.; LEE I. C.; KIM, J.; KIM, H. J.; RYU, J. S.; WOO, H. R.; NAM, H. G. Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. *Journal of Experimental Botany*, 2010. 61: (5) 1419–1430.

MARTINS, P. M. M.; LAU I. F.; BACCI M.; BELASQUE, J.; AMARAL, A. M.; TABOGA, S. R.; FERREIRA, H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiol Lett*, 2010.1–8.

MARLOVITS, T.C.; STEBBINS, E. Type III secretion systems shape up as they ship out. *Current Opinion in Microbiology*, 2010. 13:47–52.

MOREIRA, L. M.; JR, N. F. A.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, A. L.; S.S.; BORTOLOSSI, C. J.; SILVA, C. A.; SILVA, M. A.; MORAES, E. F.; OLIVEIRA J.C.; SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A.; FERRO, M.; FURLAN, L.; GIMENEZ, D.; JONES, J.; KITAJIMA, E.; LAIA, M.; LEITE, R.; NISHIYAMA, M.; NETO, J.; NOCITI, L.; NORMAN, D.; OSTRASKI, E.; PEREIRA, H.; STASKAWICZ, B.; TEZZA, R.; FERRO, J.; VINATZER, B.; SETUBAL, J. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. *BMC Genomics*, 2010. 11: 238.

MCCANN, H.C.; GUTTMAN, D.S. Evolution of the type III secretion system and its effectors in plant-microbe interactions. *New Phytol*, 2008. 177, 33-47.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962. 15:473-97.

MURASHIGE, T.; TUCKER, D.P.H. Growth factor requirement of citrus tissue culture. In: INTERNACIONAL CITRUS SYMPOSIUM. Proceedings. Riverside: University of California, 1969. (3): 1155-1169.

HUANG, P.; XIAO, M.; ZHOU, Z.; ZHU, S.; LIN, B.; ZHANG. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *NATURE BIOTECHNOLOGY* (correspondence), 2011. 29: 8.

NAVARRO, L.; DUNOYER, P.; JAY, F.; ARNOLD, B.; DHARMASIRI, N.; ESTELLE, M.; VOINNET, O.; JONES, J. D. G. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 2006. 312: 436–439.

OKUSHIMA, Y.; MITINA, I.; QUACH, H. L.; THEOLOGIS, A. Auxin Response Factor2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *The Plant Journal*, 2005. 43, 29–46 .

OLIVEIRA, M. L. P.; FEBRES, V. J.; COSTA, M. G. C.; MOORE, G. A.; OTONI, W. C. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell*, 2009. 28:387–395.

PEREIRA, A.L. A. Identificação de genes de *Citrus sinensis* com expressão dependente da proteína PthA de *Xanthomonas citri* e isolamento de elementos cis regulatórios ligantes de PthA. 2011. UNICAMP, Campinas, 31 de agosto de 2011.

PERROT-RECHENMANN, C. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010; 2(5): 001446.

PthA (pth “*peptidyl-tRNA hydrolase*” <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1155023>) A (“*Avirulence*” <http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF03377>). Acesso em: nov. 2012.

RÖMER, P.; HAHN, S.; JORDAN, T.; STRAUß, T.; BONAS, U.; LAHAYE, T. Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper Bs3 Resistance Gene. *Science*, 2007. 318, 645.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. , 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACYB, G.; SECHLERA, A.; AGARKOVAC, I.; STROMBERGA, P.E.; STROMBERGB, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006. 29: 690–695.

SHIN, R.; BURCH, A. Y.; HUPPERT, K. A.; TIWARI, S. B.; MURPHY, A. S.; GUILFOYLE, T. J.; SCHACHTMAN, D. P. The Arabidopsis Transcription Factor MYB77 Modulates Auxin Signal Transduction. *The Plant Cell*, 2007. Vol. 19: 2440–2453.

SILVA, A.; FERRO, J.; REINACH, F.; FARAH, C.; FURLAN, L.; QUAGGIO, R.; MONTEIRO-VITORELLO, C.; SLUYS, M.; ALMEIDA, N.; ALVES, L.; AMARAL, A.; BERTOLINI, M.; CAMARGO, L.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.; CICARELLI, R.; COUTINHO, L.; CURSINO-SANTOS, J.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.; FERREIRA, A.; FERREIRA, A.; FERRO, M.; FORMIGHIERI, E.; FRANCO, M.; GREGGIO, C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.; KISHI, L.; LEITE, R.; LEMOS, E.; LEMOS, M.; LOCALI, E.; MACHADO, M.; MADEIRA, A.; MARTINEZ-ROSSI, N.; MARTINS, E.; MEIDANIS, J. ; MENCK, C.; MIYAKI, C.; MOON, D.; MOREIRA, M.; NOVO, M.; OKURA, V.; OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA, V.; PEREIRA, H.; ROSSI, A.; SENA, J.; SILVA, C.; SOUZA, R.; SPINOLA, L.; TAKITA, M.; TAMURA, R.; TEIXEIRA, E.; TEZZA, R.; SANTOS, M.; TRUFFI, D. TSAI, S.; WHITE, F.; SETUBAL, J.; KITAJIMA, J. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *NATURE*, 2002. 417: 23.

SCHOLZE, H.; BOCH, J. TAL effectors are remote controls for gene activation. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14:47–53.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO PAULO.

Disponível em:

<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=845>). Acesso em: 23 jun. 2012.

SOUZA, T. A. Caracterização molecular da interação entre proteínas de citros envolvidas no controle da expressão genica e a proteína efetora bacteriana PthA indutora do cancro cítrico. 2010. UNICAMP, Campinas 28 de maio de 2010.

SZUREK, B. MAROIS, E.; BONAS, U.; ACKERVEKEN, G. V. Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *The Plant Journal*, 2001. 26(5): 523-534.

TAIZ, L.; E. ZEIGER. Chapter 19. Auxin: The growth hormone. *Plant Physiology Online*, 2006. (<http://5e.plantphys.net/chapter.php?ch=19>). Consultado em outubro de 2012.

TAMPAKAKI, A.P.; FADOULOGLOU, V.; GAZI, A.; PANOPOULOS, N. J.; KOKKINIDIS, M. Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*, 2004. 6: 805-16.

TIWARI, S. B.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin-Responsive Transcription. *The Plant Cell*, 2003. 15: 533–543.

THE *XANTHOMONAS* RESOURCE. Disponível em: <http://www.xanthomonas.org/t3e.html>. Acesso em: Jan. 2013.

TOLEDO, M.; CASTILLO, R. Grandes empresas e uso corporativo do território: o caso do circuito espacial produtivo da laranja. *Geosul, Florianópolis*, 2008. 23: 79-93.

TONDO, M. L.; PETROCELLI, S.; OTTADO, J.; ORELLANO, E. G. The Monofunctional Catalase KatE of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Is Required for Full Virulence in Citrus Plants. *journal.pone.0010803 PLoS ONE*, 2010. 5(5): 10803.

ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. Activation and repression of transcription by auxin response factors (transcriptional activators/dimerization domain/AuxRE). *Plant Biology*, 1999. 96: 5844–5849.

ULMASOV, T.; LIU, Z.-B.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T. J. Composite Structure of Auxin Response Elements. *The Plant Cell*, 1995. 7: 1611-1623.

WANG, H, JONES, B.; LI, Z.; FRASSE, P.; DELALANDE, C.; REGAD, F.; CHAABOUNI, S. LATCHE, A.; PECH, J.; BOUZAYEN, M. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell*, 2005. 17: 2676-92.

WEIJERS, D.; SAUER, M.; MEURETTE, O.; FRIM, J.; LJUNG, K.; SANDBERG, G.; HOOYKAAS, P. Remko Offringa Maintenance of Embryonic Auxin Distribution for Apical-Basal Patterning by PIN-FORMED–Dependent Auxin Transport in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2005. 17: 2517 -2526.

YANG, B.; ZHU, W.; JOHNSON, L. B.; WHITE F. F. The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathwaydependent nuclearlocalized doublestranded DNA-binding protein. PNAS, 2000. 97 (17): 9807–9812.