

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Raúl Andrés Cernadas



“Expressão Diferencial de Genes de Laranja doce em Resposta a
Infecção por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *axonopodis* pv.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
RAÚL ANDRÉS CERNADAS
e aprovada pela Comissão Julgadora.

aurantifolii”

Celso Benedetti

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética Vegetal
e Melhoramento.

Orientador: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Campinas, 2008.

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

C335a

Cernadas, Raul Andres

Expressão diferencial de genes da laranja doce em resposta a infecção por *Xanthomonas axonopodis* pv. citri e *axonopodis* pv. aurantifolii / Raul Andres Cernadas. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Celso Eduardo Benedetti.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. 2. Cancro cítrico.
3. Expressão genica. I. Benedetti, Celso Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
III. Título.

Título em inglês: Gene expression analysis in sweet orange in response to *Xanthomonas axonopodis* pv citri and *Xanthomonas axonopodis* pv aurantifolii.

Palavras-chave em inglês: *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.; Citrus canker; Gene expression.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Celso Eduardo Benedetti, Michel Georges Albert Vincentz, Marcos Antonio Machado, Ivan de Godoy Maia, Elizabeth Pacheco Batista Fontes.

Data da defesa: 09/12/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 9 de Dezembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Benedetti (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz



Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antonio Machado



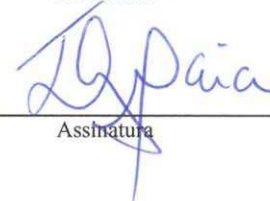
Assinatura

Profa. Dra. Elizabeth Pacheco Batista Fontes



Assinatura

Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia



Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Assinatura

Profa. Dra. Miriam Perez Maluf

Assinatura

Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Celso Benedetti, por ter confiado em mim para desenvolver este trabalho. Por ter me ensinado tantas coisas importantes durante estes anos de orientação e por sua paciência durante momentos difíceis.

À FAPESP e ao LNLS pelo apoio financeiro.

Aos meus queridos colegas do laboratório, aqueles que me viram chegar e estes que me virão partir, foi para mim um prazer fazer parte desta equipe.

Ao pessoal técnico do laboratório, especialmente a Andréia Navarro, Givanil Garrido e Maria Eugenia Camargo e Renata Rocha. Espero que não me seja tão difícil encontrar pessoas como estas durante minha vida.

Aos meus queridos amigos brasileiros que sempre vou lembrar e levar comigo: Glaubert Alves (*goiano*), Luiz Guilherme Tessaroli (*Baludo*), Tereza Lima (*Tetê*), Marcos Brandalise (*branda*), Mario Sanches, Fabio Cupri e Marcos Navarro.

Aos meus grandes amigos de sempre, Juan Pablo, Alejandro, “*Doque*” e “*el negro*” obrigado pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. Ivan Maia e a Dra. Andréa Akemi pela bem-vinda em Botucatu e pela ajuda com o PCR em tempo real.

Ao Dr. Marcos A. Machado e Dr. Alexandre Moraes do Amaral pela generosa disposição a participar da banca previa à defesa de doutorado e, pelas valiosas dicas durante essa etapa.

Aos membros desta banca, distinguidos pesquisadores do Brasil.

A Carolina, por me ensinar a ser melhor cada dia, por seu carinho, sua amizade, sua companhia e seu talento que tanto admiro em silêncio.

Aos meus irmãos, Laura e Jorge, pela alegria e satisfação que me causa ouvi-los. Ao meu primeiro sobrinho, Juan Ignacio pelas coisas novas que ele trouxe à nossa família durante este seu primeiro ano de vida.

À minha mãe, Maria Isabel (*la mary*), por estar do meu lado sempre que é preciso, por nós mostrar e demonstrar que o sacrifício sempre tem sua recompensa. Pela grandiosa coragem para ir sempre para frente e ficar em pé ante a adversidade. Por ser a figura de pessoa que um dia quero igualar.

As outras pessoas que contribuíram em algum momento deste processo, sinceramente obrigado.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1- O cancro cítrico.....	1
1.2- Ciclo da doença e medidas de controle.....	3
1.3- A bactéria causadora do cancro cítrico: <i>Xanthomonas axonopodis</i>	4
1.4- Mecanismos moleculares da família de proteínas avrBs3/ptha.....	7
1.5- Análises transcricionais durante interações planta – patógeno.....	9
2- OBJETIVOS.....	11
3- RESULTADOS.....	12
3.1- Capítulo I.....	12
Artigo científico. “Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri and <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. aurantifolii”.....	14
3.2- Experimentos complementares do capítulo I.....	41
3.3- Capítulo II.....	54
Artigo científico submetido. “Auxin and Gibberellin-mediated expression of cell wall remodeling genes induced by <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv citri”.....	58
3.4- Experimentos complementares do capítulo II.....	76
3.5- Capítulo III.....	82
“Isolamento e caracterização de regiões promotoras de genes que são induzidos precocemente durante a infecção com <i>Xanthomonas</i> ”.....	82
3.6- Materiais e métodos do capítulo III.....	85
3.7- Resultados do capítulo III.....	90
4- DISCUSSÃO GERAL.....	96
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Lesões características do cancro cítrico.	1
FIGURA 2. Ciclo do cancro cítrico.....	3
FIGURA 3. Estrutura de AvrBs3 e PthA4.....	7
FIGURA 4. Clones da Biblioteca de cDNA de citros digeridos com <i>Pst</i> I e <i>Eco</i> RI.....	42
FIGURA 5. Duplo-híbrido em leveduras. Interação de PthA2 com PrmC3, Ciclofilina e α -Importina.....	45
FIGURA 6. Sequencia de Adaptadores utilizados utilizados para SSH.....	46
FIGURA 7. PCR de clones das bibliotecas subtrativas <i>forward</i> e <i>reversa</i>	46
FIGURA 8. Experimento de <i>Dot blot</i> com as bibliotecas <i>forward</i> e <i>reversa</i>	47
FIGURA 9. <i>Differential Display</i> (DD PCR) em Géis de poliacrilamida.....	48
FIGURA 10. Tratamento das amostras de RNA com DNaseI.....	49
FIGURA 11. Análise de PCR quantitativo em tempo real.....	50
FIGURA 12. <i>Northern blot</i> com a referencia interna (EST CK937155).....	50
FIGURA 13. Digestão de plasmídios, <i>PthCs</i> , de Xaa com <i>Ssp</i> I.....	52
FIGURA S1. <i>Northern blot</i> . Expressão diferencial de genes de remodelamento da parede celular entre folhas de laranja doce infiltradas com Xac ou Xaa.....	39
FIGURA S2. Nível de expressão de provável cisteína protease em laranja doce e limão galego infiltrados com Xac e Xaa.....	40
FIGURA 14. Possíveis miRNAs da via de sinalização de auxina em <i>C. sinensis</i>	79
FIGURA 15. Alinhamento sequencial de EST de citros similar com proteína DICER.....	80
FIGURA 16. Expressão gênica de DICER1, ARF10, miRNAs160, 164 e 167 em Laranja doce.....	81
FIGURA 17. Procedimento para o isolamento das regiões 5' de genes PR.....	86
FIGURA 18. Produtos de PCR primários e secundários.....	90
FIGURA 19. Análise da região 5' de <i>PR-5.2</i>	90
FIGURA 20. Alinhamento dos clones 5' <i>PR-1</i> e 5' <i>PR-5.2</i> com o <i>upa20</i> e <i>Bs3</i> de pimenta.....	91
FIGURA 21. Purificação das isoformas de PthA de Xac.....	92
FIGURA 22. Espectro de dicroísmo circular de PthA4.....	93
FIGURA 23. EMSA com as isoformas de PthAs e regiões 5' de <i>PR-5.2</i>	93
FIGURA 24. EMSA com as isoformas de PthAs e regiões 5' de <i>PR-1</i>	94
FIGURA 25. Expressão transiente de <i>uidA</i> em folhas de <i>N. benthamiana</i>	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Membros da família gênica <i>avrBs3/pthA</i>	6
TABELA S1. Genes diferencialmente expressos em resposta a Xac ou Xaa isolados por DD PCR ou SSH e confirmados por qPCR em tempo real.....	37
TABELA 2. Adaptadores para SSH	46
TABELA 3. Proteínas, ESTs e oligos para isolamento de promotores.....	85
TABELAS S2 A S9. Não foram adicionadas nesta tese devido ao grande volume desse material. Estas tabelas estão disponíveis em “supporting material” de Cernadas et al., 2008.	

LISTA DE ABREVIACÕES

AAD	Domínio cido de ativação de transcrição
CCC	<i>Chlorocoline Chloride</i>
cDNA	DNA complementar
DD PCR	<i>Differential display PCR</i>
DNA	cido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (Adenina, Citosina, Guanina e Timina)
EMSA	Ensaio de retardamento de mobilidade eletroforética (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i>)
GA₃	<i>Gibberellic Acid</i>
Hai	Horas após da infecção
HR	Resposta de hipersensibilidade (<i>hypersensitivity response</i>)
LB	Meio de culturas “Luria Bertani”
NAA	<i>1-Naphthaleneacetic Acid</i>
NLS	Regiões de localização nuclear
PCR	Reao em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
Proteínas PR	Proteínas relacionadas com patogenicidade (<i>pathogenesis related proteins</i>)
RNA	cido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RT-PCR	<i>Reverse transcription PCR</i>
SSH	Hibridação subtrativa suprimida (<i>Suppression subtractive hybridization</i>)
SST3	Sistema <u>S</u> ecretrio <u>T</u> ipo III
Xaa	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>aurantifolii</i>
Xac	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
Xcv	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>

RESUMO

A forma mais agressiva de cancro cítrico, cancrose A, é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Xac), que ataca qualquer variedade ou espécie de citros. Além de Xac, *Xanthomonas axonopodis* pv *aurantifolii* (Xaa) causa um tipo mais leve da doença, cancrose C, restrita ao limão Galego (*Citrus aurantifolii*). Na laranja Pêra (*Citrus sinensis*), Xaa provoca uma resposta de defesa que impede o desenvolvimento dos sintomas do cancro incluindo a ruptura da epiderme que é fundamental à disseminação da bactéria. Neste trabalho, abordamos a patogenicidade diferencial entre Xac e Xaa na laranja Pêra para estudar a expressão gênica na planta associada ao desenvolvimento dos sintomas (hipertrofia e hiperplasia celular) e à resposta de defesa.

O projeto apresenta a identificação e caracterização de genes expressos diferencialmente em resposta à infecção por Xac e Xaa responsáveis pelo cancro cítrico. A partir de três estratégias independentes (Display diferencial de PCR, Hibridação subtrativa suprimida e micro arranjos de DNA) detalhou-se o perfil transcricional de folhas de laranja infiltradas com Xaa, Xac ou água como controle. Mais de 120 genes candidatos foram validados através de PCR quantitativo em tempo real ou hibridação *Northern*. Os genes diferencialmente expressos a 6 ou 48 hs após da infecção (hai) aparecem agrupados em categorias funcionais como: remodelamento de parede celular, divisão e expansão celular, tráfego de vesículas, resposta de defesa, metabolismo de nitrogênio e carbono e sinalização de hormônios como auxina, giberelina e etileno.

Inicialmente, tanto Xaa quanto Xac induzem respostas de defesa associadas com ataque de patógenos incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio e lignificação da parede celular. Notavelmente, a mudança no perfil transcricional mostra que Xac suprime as defesas da planta entre 6 e 48 hai, ao mesmo tempo em que induz genes relacionados com o metabolismo da parede celular, divisão celular e tráfego de vesículas, entre outros. A consequência dessa manipulação transcricional no hospedeiro por parte de Xac dá origem a um estado fisiológico típico de expansão celular (hipertrofia). O inibidor de tráfego de vesículas, Brefeldina A, atrasou o desenvolvimento dos sintomas do cancro, indicando que essa atividade está mais relacionada com hipertrofia celular do que com respostas de defesa.

No perfil transcricional de folhas infectadas com Xaa destaca-se a ativação de uma via de sinalização por proteína quinase ativada por patógeno, envolvendo também fatores de transcrição do tipo WRKY, assim como elementos de resposta a etileno.

Tanto Xac quanto Xaa parecem modular a transcrição de genes relacionados com sinalização e transporte de auxinas e biosíntese de giberelina. O tratamento de folhas de laranja com, ácido naftalenoacético (NAA) e ácido giberélico (GA₃) demonstrou que esses hormônios induzem a expressão de genes de remodelamento de parede celular, biosíntese de giberelina e sinalização de auxina. Além disso, o inibidor de biosíntese de giberelina (*Chlorocoline Chloride*) diminuiu significativamente a expressão de genes induzidos por NAA sugerindo que exista uma regulação cruzada entre auxina e giberelina que controla a expressão de genes relacionados com divisão e expansão celular em citros.

Finalmente, duas regiões promotoras de genes que codificam proteínas relacionadas com patogenicidade (*PR-1* e *PR-5*) foram isoladas e caracterizadas. Esses genes são fortemente induzidos por Xaa e Xac em 6 e 48 hai. Substancialmente, existem elementos similares com o “*upa box*” nas regiões promotoras de *PR-1* e *PR-5*. Mediante experimentos de *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) demonstrou-se que a proteína PthA4 de *Xanthomonas* é capaz de ligar-se no “*upa box*” presente nos promotores de *PR-1* e *PR-5*. Tanto o promotor de *PR-1* quanto o de *PR-5* dirigem a expressão transitória do gene repórter *uidA* em *N. benthamiana* mediante Agro infiltração.

ABSTRACT

The most aggressive form of the citrus canker disease is caused by the bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), which can infect all commercial varieties or species of citrus. In addition to Xac, *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xaa) causes a weaker form of the disease, known as cancrose C, which is restricted to Mexican Lime (*Citrus aurantifolii*). In sweet orange (*Citrus sinensis*), Xaa triggers a defense response that halts the canker-symptoms development including the epidermal rupture, which is essential for bacterial dissemination. In this work, we approached the differential pathogenicity existing between Xac and Xaa in order to survey the host gene expression associated with symptoms development (cellular hypertrophy and hyperplasia) and defense response in sweet orange.

The project presents the identification and initial characterization of differentially expressed genes in response to the infection with the citrus canker pathogens, Xac and Xaa. Three independent strategies were conducted in order to have a detailed transcriptional profiling of orange leaves infected with Xaa, Xac or water as mock control (Differential Display PCR, Suppression Subtractive Hybridization and GeneChip Microarrays). More than 120 candidate genes were validated through quantitative real time PCR or *Northern* blot. The differentially expressed genes at 6 or 48 hours after infection (hai) were grouped into functional categories: cell-wall remodeling, cell division and expansion, vesicle trafficking, carbon and nitrogen metabolism or hormone signaling, auxin, gibberellin and ethylene.

Initially, both Xaa and Xac elicit a defense response associated with pathogen attack that includes the production of reactive oxygen species (ROS) and cell-wall lignification. Notably, the changes in the transcriptional profiles show that Xac suppresses the plant defenses between 6 and 48 hai and at the same time it induces genes related to the cell-wall metabolism, cell division and vesicle trafficking among others. The consequence of this host manipulation by Xac originates a physiological state very similar to that of cell expansion (hypertrophy). The vesicle trafficking inhibitor, Brefeldin A, delayed the development of canker symptoms indicating that this activity is more related to the cellular enlargement than to the defense responses.

The transcriptional profile of Xaa-infiltrated leaves highlights the activation of a mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway related to pathogen attack

with the involvement of other components of defense responses like WRKY-transcriptional factors and ethylene-response elements.

Both Xac and Xaa appear to modulate the transcription of genes related to auxin signaling and transport and gibberellin biosynthesis. Treatments of orange leaves with *1-naphthylphthalamic acid* (NAA) e *Gibberellic Acid* (GA₃) demonstrated that these hormones induce the expression of genes related to cell-wall remodeling, gibberellin biosynthesis and auxin signaling. Moreover, the gibberellin-biosynthesis inhibitor (*Chlorocoline Chloride*) decreased significantly the expression of auxin-induced genes suggesting a cross-talk regulation between auxin and gibberellin controlling the expression of citrus genes associated with cell division and expansion.

Finally, two promoter regions of the pathogenesis related (PR) genes, *PR-1* and *PR-5.2*, were isolated and characterized. These genes are strongly up-regulated by Xaa and Xac at 6 or 48 hai. Substantially, there are “*upa*” box-like motifs in the promoter regions of both *PR-1* and *PR-5.2*. By means of Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) we have demonstrated that PthA4 from Xac is capable of binding the “*upa*” box-like regions found in *PR-1* e *PR-5* promoters. Furthermore, both of the isolated promoters (*PR-1* and *PR-5*) address the transient expression of the reporter gene *uidA* in *N. bethamiana* leaves through agroinfiltration.

1- INTRODUÇÃO

1.1- O cancro cítrico

O cancro cítrico é uma doença que afeta significativamente a citricultura em várias partes do mundo. Esta doença é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) e se caracteriza por lesões que aparecem em folhas, frutos e ramos. As lesões surgem como pequenos cancrios ou pústulas de aspeto esponjoso e corticoso, de coloração marrom-escura que podem estar circundadas por halos cloróticos (Figura 1).



Figura 1. A) Lesões características do cancro cítrico em ambos os lados da folha de *Citrus paradisi* (Pomelo). B) Detalhe das pústulas formadas na parte inferior de folhas de Pomelo. C) Lesões de cancro mais antigas que aparecem em ramos de Limão galego (*C. aurantifolii*). Fotografias de Jeffrey W. Lotz e Timothy Schubert. Florida Department of Agriculture and Consumer Services.

O Brasil conta com o maior parque citrícola do mundo e é o principal exportador mundial de suco de laranja concentrado (Estanislau et al., 2001; Rodrigues Neto e Baldini Ribeiro, 2002). No Estado de São Paulo, a citricultura é a segunda atividade rural em importância, menor apenas que a da cana-de-açúcar. São aproximadamente 600 mil hectares de área cultivada, 77% das quais aparece na região Sudeste. A laranja representa 49% de toda a produção brasileira de frutas e, cabe também destacar que o suco de laranja produzido no Brasil atende 50% da demanda internacional. O setor citrícola emprega diretamente cerca de 400 mil pessoas, gerando divisas superiores a 1,5 bilhões de dólares (US\$) anuais (Neves et al., 2004; Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos).

Além do cancro cítrico, algumas doenças que causam danos resultando na queda da produtividade e da qualidade dos frutos são: a clorose variegada dos Citrus (CVC), o *greening* (*Huanglongbing*), a tristeza e a morte súbita dos citros. Em particular, o cancro

cítrico se destaca como uma das mais prejudiciais, principalmente pela sua fácil disseminação e por atacar todas as variedades e espécies de citros.

No país, o cancro foi descrito pela primeira vez em 1957 e desde então foi diagnosticado em todo o Estado de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Minas Gerais e, mais recentemente, em 2002, no Estado de Roraima (Rodriguez Neto e Baldini Ribeiro, 2002; Nascimento et al., 2003).

As lesões nos frutos podem ser intensas, o que deprecia consideravelmente a qualidade do produto, e quando a infecção é severa, ocorre desfolhação na planta junto com a queda prematura dos frutos, os quais se tornam impróprios para o comércio (Gottwald et al., 2002; Rodrigues Neto e Baldini Rivero, 2002). Além disso, existem barreiras fitossanitárias internacionais que impedem o comércio de produtos provenientes de áreas afetadas pela doença.

As plantas de citros apresentam maior suscetibilidade ao cancro durante a fase juvenil e o maior índice de infecção ocorre nos períodos de maiores chuvas, ventos e temperaturas elevadas, fatores preponderantes para a disseminação do patógeno (Koizumi et al., 1996; Stall e Seymour, 1983). O uso de variedades de citros resistentes ao cancro como forma de controle da doença tem enfrentado dificuldades, principalmente porque não existem plantas de citros resistentes à bactéria e também porque a variabilidade genética entre os cultivares comerciais é baixa. Mesmo as espécies não comerciais como calamondin (*Citrus mitis*) e kumquat (*Fortunella* spp), consideradas altamente resistentes à Xac em condições de campo, são susceptíveis quando infiltrados com uma suspensão da bactéria (Gottwald et al., 1993). Além disso, fatores biológicos como longo período reprodutivo, incompatibilidade entre espécies, alta heterozigose, esterilidade, apomixia, entre outras, têm sido as principais limitações para a obtenção de novas variedades comerciais de citros com maior resistência a patógenos (Oliveira et al., 2002).

Estratégias para obtenção de plantas de citros transgênicas através de transformação de protoplastos, bombardeamento de embriões ou transformação por *Agrobacterium tumefaciens* já foram reportadas (Moore et al., 1992; Peña et al., 1997; Cervera et al., 1998; Mendes-da-Glória et al., 2000; Moura et al., 2001; Mendes et al., 2002). Da mesma forma, outras técnicas como regeneração somática, fusão de protoplastos e organogênese *in vitro* tem sido abordadas com o objetivo de se obter híbridos com características agronômicas de interesse (Moura et al., 2001; Mendes-da-Glória et al., 2000).

1.2- Ciclo da doença e medidas de controle

A bactéria causadora do cancro cítrico penetra no tecido vegetal através dos estômatos ou por ferimentos na epiderme de folhas, frutos ou ramos. Uma vez no espaço apoplástico do hospedeiro, Xac cresce rapidamente produzindo abundante polissacarídeo extracelular (EPS), principalmente goma xantana. Em paralelo com o crescimento da bactéria, também ocorre aumento do tamanho (hipertrofia) e divisões mitóticas (hiperplasia) das células hospedeiras provocando uma dramática diminuição dos espaços intercelulares no mesófilo. O acúmulo da goma xantana dá o aspecto de encharcamento (“water-soaking”) no tecido infectado devido ao alto potencial higroscópico da goma, que prende a água proveniente do xilema. À medida que as lesões envelhecem, tornam-se escuras, adquirindo uma tonalidade marrom produto da necrose na área infectada (Figura 1). Durante esta fase, a epiderme do tecido se rompe e a bactéria é liberada para o exterior proporcionando o inóculo para transmissão da bactéria em outros tecidos e plantas (Figura 2).

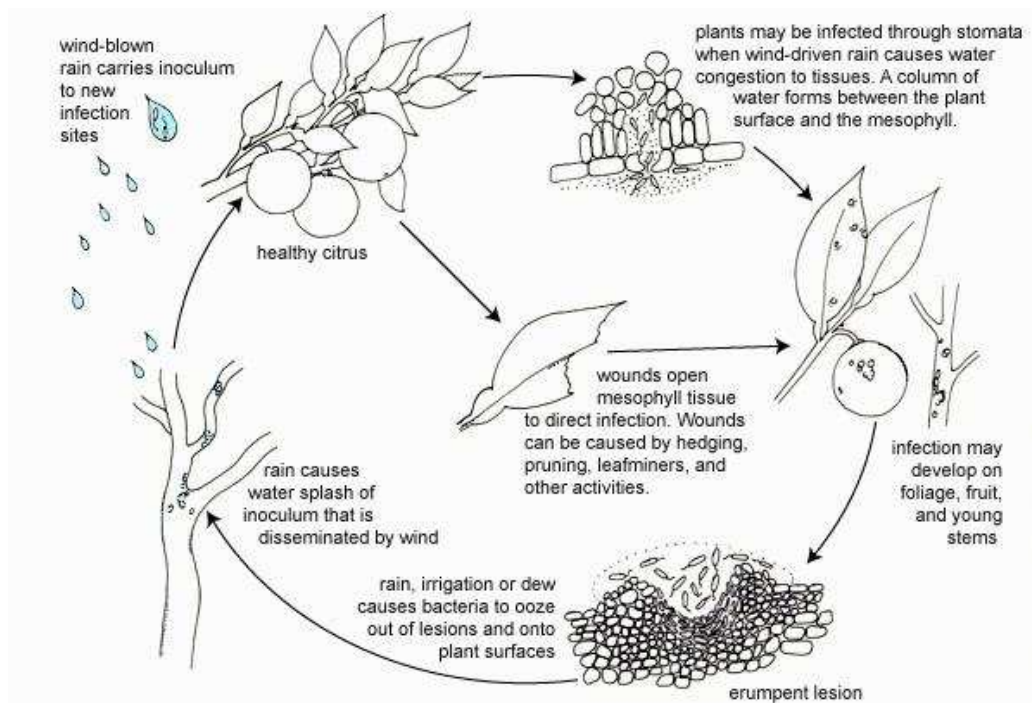


Figura 2. Ciclo da doença. A bactéria penetra pelos estômatos na folha ou por ferimentos presentes na planta. Uma vez dentro da planta, Xac se multiplica e paralelamente promove hipertrofia e hiperplasia das células do hospedeiro. As erupções formadas no tecido infectado colapsam, sofrem ruptura da epiderme e, a bactéria é conseqüente liberada ao exterior. A seguir fatores ambientais como pingos de chuva geram aerossóis da bactéria que são por sua vez espalhados pelo vento dentro do pomar. Gottwald, 2000.

Uma vez instalada a doença, a bactéria se dissemina facilmente dentro do pomar sendo o próprio homem o principal responsável dessa disseminação por meio de materiais de colheita, poda com ferramentas contaminadas e trânsito indiscriminado de pessoas pelos pomares. A disseminação de um pomar para outro ocorre principalmente mediante mudas contaminadas, porém fatores ambientais como chuvas e ventos fortes são também determinantes para o espargimento da bactéria (Fundo de Defesa da Citricultura. FUNDECITRUS). Além disso, insetos herbívoros como a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) geram galerias nas folhas tornando-as mais susceptíveis à infecção por aerossóis contendo a bactéria (Belasque Jr et al., 2001).

Não existe método curativo para a doença e o combate ao cancro cítrico é feito através da erradicação do material contaminado. Até setembro de 2008, mais de 200.000 plantas foram erradicadas na região de São Paulo e triângulo mineiro (FUNDECITRUS). Por essa razão, várias medidas de prevenção visando eliminar o cancro cítrico foram estabelecidas na Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC) criada em 1974 pelo Ministério de Agricultura do Brasil. Entre as medidas de controle e prevenção mais importantes cabe destacar o uso de mudas sadias certificadas como livre de doenças, a desinfestação de todo material de colheita ou poda, o uso de quebra ventos nas fronteiras do pomar para diminuir a ação do vento dentro da lavoura e essencialmente, a inspeção rotineira dos pomares para detectar rapidamente possíveis focos da doença (FUNDECITRUS; Rodriguez Neto e Baldini Ribero, 2002).

Graças ao esforço do FUNDECITRUS e da Secretaria de Agricultura e Abastecimento na fiscalização e erradicação de plantas doentes, o controle da doença foi garantido no Estado de São Paulo. Um aspecto positivo é que a doença não foi detectada em viveiros durante 2008, ao passo que em 2007 cerca de 150.000 plantas infectadas foram eliminadas de viveiros da região (Incidência do cancro cítrico 2007. FUNDECITRUS).

1.3- A bactéria causadora do cancro cítrico: *Xanthomonas axonopodis*

O gênero *Xanthomonas* compreende bactérias Gram-negativas que estão fortemente associadas com plantas embora nem sempre sejam patogênicas. Comumente apresentam uma cor verde-amarelo resultado da produção do pigmento xantomonadina (Jenkins and Starr, 1985). Existem dois grupos filogeneticamente distintivos da bactéria que podem causar cancro cítrico. O grupo asiático é o principal e esta composto por Xac, que causa cancrose A, também conhecida como Asiática, e consiste na forma mais agressiva da

doença, de ampla ocorrência e que afeta todas as variedades de citros comerciais (Gottwald et al., 2002; Rodriguez Neto e Baldini Ribero, 2002). O segundo grupo é o sul americano, composto por *Xanthomonas axonopodis* pv *aurantifolii* (Xaa) cujos patotipos B e C infectam preferencialmente o limão verdadeiro (*Citrus limon*) e o limão Galego (*Citrus aurantifolii*). A “cancrose B” ataca as duas variedades de limão e ocorre na Argentina, Paraguai e Uruguai. Entretanto, o patotipo C foi detectado apenas no Brasil (Namekata, 1971) e está restrito a determinadas regiões de São Paulo afetando unicamente ao limão Galego. Significativamente, tanto Xac quanto Xaa causam sintomas idênticos da doença o que indica que estas bactérias empregam mecanismos comuns de patogenicidade (Brunings e Gabriel, 2003).

Além disso, dois novos patotipos associados com o grupo Asiático foram caracterizados, o patotipo A* no sul-oeste da Ásia e o patotipo A^w na Flórida (Estados Unidos), sendo que ambas formas de cancro afetam apenas ao limão galego (Verniere et al., 1998 ; Sun et al., 2000). Os motivos da especificidade de hospedeiros de Xaa assim como dos patotipos A* e A^w são ainda desconhecidos.

Os genes de avirulência (*avr*) de *Xanthomonas* são diversos e codificam proteínas com baixa similaridade com exceção da família gênica *avrBs3/pthA*. A maioria dos genes *avr* foi identificada em bactérias fitopatogênicas por induzir resposta de hipersensibilidade (HR) em plantas que possuem o gene de resistência (R) correspondente (Lam et al., 2001). Apesar disso, esses genes desempenham um papel central na virulência da bactéria durante as interações compatíveis (Lahaye e Bonas, 2001). Genes *avr* codificam proteínas efetoras que são translocadas da bactéria para o interior da célula vegetal pelo Sistema Secretório Tipo III (SST3), codificado pelo “regulon” *hrp* (resposta de hipersensibilidade e patogenicidade) (Lahaye e Bonas 2001; Buttner e Bonas, 2002). O SST3 é essencial tanto para patogenicidade quanto para avirulência, pois ele permite à bactéria injetar indiscriminadamente proteínas Avr no interior da célula hospedeira, as quais determinam, pelo menos em parte, a especificidade de hospedeiros (Fouts et al., 2003).

As proteínas AvrBs3 de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* e PthA de Xac pertencem à família gênica *avrBs3/pthA* que compreende um grande número de proteínas conservadas no gênero *Xanthomonas* (Tabela 1). Tanto o *avrBs3* quanto o *pthA* codificam para proteínas que possuem 17.5 domínios repetitivos, ricos em leucina, compostos por 34 aminoácidos (17.5 x 34), duas regiões de localização nuclear (NLS) e um domínio

carboxila terminal ácido (AAD) característico de fatores de transcrição eucarióticos (Figura 3) (Bonas et al, 1989; Swarup et al, 1991).

Tabela 1. Membros da família gênica *avrBs3/pthA*

Nome	GeneBank	Dominios repetitivos
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>		
AvrBs3	X16130, CAA34257	17.5 x 34
AvrBs4	X68781, CAA48680	17.5 x 34
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>		
AvrXa3	AY129298, NC 006834, AAN01357, YP 199878.1	8.5 x 34
AvrXa5	AY377126, AAQ79773	5.5 x 34
AvrXa7	AF262933, AAF98332, AAF98343	25.5 x 34
AvrXa10	U50552, AAA92974	15.5 x 34
AvrXa27	AY986494, AAY54168	16.5 x 34
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>		
Avr/pth3	AY875712, AAW59492	15.5 x 34
Avr/pth13	AY875711, AAW59491	5.5 x 34
Avr/pth14	AY875713, AAW59493	19.5 x 34
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>armoraciae</i>		
Hax2	AY993937	21.5 x 35
Hax3	AY993938	11.5 x 34
Hax4	AY993939	14.5 x 34
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>		
Avrb6	L06634, AAB00675	13.5 x 34
PthN	AF016221, AAB69865	13.5 x 34
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>		
Apl1	AB021363, BAA37119	17.5 x 34
Apl2	AB021364, BAA37120	15.5 x 34
Apl3	AB021365, BAA37121	23.5 x 34
PthA	U28802, AAC43587	17.5 x 34
PthA1	XACa0022, AAM39226	16.5 x 34
PthA2	XACa0039, AAM39243	15.5 x 34
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i>		
pTHB	AF012325, AAD01494	12.5 x 34
<i>Ralstonia solanacearum</i>		
Brg11	NC 003295, NP 519936	16.5 x 35

PthA foi um dos primeiros genes de virulência para o qual se demonstrou uma função no desenvolvimento dos sintomas no hospedeiro; ele é necessário à bactéria para ocasionar os sintomas do cancro cítrico (Swarup et al, 1991) e quando expresso transitoriamente em folhas de laranja causa hipertrofia e hiperplasia celular (Duan et al, 1999). Tal resposta parece ser específica de citros porque, i) quando *pthA* é inserido nas cepas *X. phaseoli* e *X. campestris* pv *malvacearum*, os transformantes induzem HR nas hospedeiras feijão e algodão, respectivamente (Swarup et al., 1992) e, ii) a expressão transitória de *pthA* em plantas não hospedeiras de Xac como tabaco, feijão ou algodão levam à uma reação do tipo HR (Duan et al, 1999). Esses fatos sugerem a existência de genes R em plantas não hospedeiras que são capazes de reconhecer a proteína PthA e desencadear uma resposta de defesa (Bruning e Gabriel, 2003). A descoberta desses genes R pode ser útil para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a Xac.

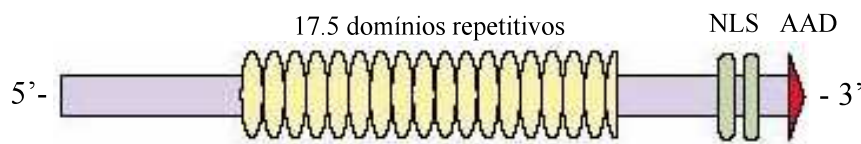


Figura 3. Estrutura modular de avrBs3 e seu análogo pthA4. Estes genes contem 17.5 repetições do domínio central rico em leucina, duas regiões de localização nuclear (NLS) e um domínio ácido de ativação de transcrição (AAD). A porção N-terminal não é necessária para desenvolvimento dos sintomas. (Lahaje e Bonas, 2001)

1.4- Mecanismos moleculares da família de proteínas *avrBs3/pthA*

Cerca de 20 proteínas efetoras são injetadas no hospedeiro através do SST3 de *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Xcv) (Thieme et al., 2005). Um desses efetores que pertence à família de proteínas *avrBs3/pthA* é o AvrBs3, o qual dispara uma resposta de HR em plantas de pimenta (*Capsicum annuum*) que expressam o gene de resistência *Bs3*, sendo este um caso atípico de reconhecimento gene-a-gene (Römer et al., 2007). Inicialmente mostrou-se que mutações locais nas regiões NLS ou AAD de *avrBs3*, suprimem a resposta de HR na planta mediada por *Bs3*, indicando a possível função de AvrBs3 no núcleo da célula hospedeira como um fator de transcrição (Szurek et al., 2001; Szurek et al., 2002). A seguir, Römer e colaboradores descobriram o alvo específico de AvrBs3 em plantas de pimenta resistentes (ECW-30R). O efector AvrBs3 se liga diretamente na região promotora do gene *Bs3* e ativa sua transcrição, o que leva à resposta de HR (Römer et al., 2007). Notavelmente, a proteína AvrBs4 de Xcv que é 97% idêntica à AvrBs3, é incapaz de transativar *Bs3* e promover a resposta de HR. Da mesma forma que AvrBs4, AvrBs3Δrep16 (13.5 x 34) que contem quatro domínios repetitivos a menos que AvrBs3, liga fortemente a região promotora de *Bs3*, mas não é capaz de ativar transcrição sugerindo um posicionamento incorreto ou inadequado do AAD sob essa região promotora (Römer et al., 2007). No entanto, em plantas de pimenta susceptíveis (ECW) que possuem o alelo *Bs3-E* do gene *Bs3*, AvrBs3Δrep16 causa HR através da ativação direta do gene *Bs3-E*. Em plantas ECW, *Bs3-E* é o alelo funcional de *Bs3* e as regiões codantes destes alelos diferem em apenas uma única base que gera a troca de um aminoácido sem afetar a função da proteína. A principal diferença entre *Bs3-E* e *Bs3* resulta ser uma inserção de 13 pares de bases (pb) na região promotora do gene *Bs3*. Esta inserção altera a especificidade do promotor impedindo a ligação de AvrBs3, mas não a de AvrBs3Δrep16, que transativa o gene R provocando HR (Römer et al., 2007).

Por outro lado, AvrBs3 também pode causar hipertrofia das células do mesófilo de plantas susceptíveis como pimenta ou tomate (Marois et al., 2002). O efector forma homodímeros no citoplasma do hospedeiro, que logo são importados ao núcleo celular através de interação com α -importinas (Gürlebeck et al., 2005). A seguir, AvrBs3 promove ativação transcricional de genes envolvidos no controle da expansão celular como expansinas e genes induzidos por auxinas (Marois et al., 2002). Significativamente, um dos genes induzidos por AvrBs3, codifica um fator de transcrição do tipo hélice-giro-hélice denominado *upa20*, cuja expressão transiente causa hipertrofia em *N. benthamiana* assim como em outras solanáceas (Kay et al., 2007). *Upa20* é um controlador “master” do tamanho celular e que também promove expansão celular, em parte, ativando a transcrição da expansina *upa7* (Kay et al., 2007). Da mesma forma que ocorre em plantas de pimenta resistentes (ECW-30R) com a expressão do gene *Bs3*, nenhuma das proteínas AvrBs4 ou AvrBs3 Δ rep16 conseguem transativar *upa20*, sendo incapazes de causar hipertrofia em plantas susceptíveis (ECW). A partir dessas evidências, foi caracterizada uma região no promotor do gene *upa20* que se nomeou *upa* box e que também está presente no promotor de *Bs3*. A indução de *upa20* ou *Bs3* ocorre através da ligação direta de AvrBs3 no *upa* box desses genes durante a interação compatível ou incompatível, respectivamente (Kay et al., 2007).

Embora o caso do AvrBs3 seja o mais bem caracterizado na atualidade, outras proteínas da família gênica *avrBs3/pthA* também foram reportadas por induzirem ativação gênica específica nos hospedeiros. Em arroz, por exemplo, a proteína de avirulência AvrXa27 de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* (Xoo) induz a transcrição do gene de resistência *Xa27* que gera uma resposta de defesa. Os alelos gênicos do *Xa27* presentes em plantas resistentes ou susceptíveis diferem unicamente na região promotora, indicando que o alvo de AvrXa27 estaria, mais uma vez, no promotor do alelo resistente. Entretanto, ainda não foi demonstrado se AvrXa27 age diretamente no promotor de *Xa27* ou, se talvez necessite de outros fatores de transcrição endógenos para funcionar (Gu et al., 2005). Da mesma forma, o gene *pthXo1* de Xoo (PXO99^A) promove a indução do gene *Os8N3* em plantas susceptíveis à bactéria. *Os8N3* codifica uma provável proteína integral de membrana de função desconhecida. O silenciamento do *Os8N3* através de RNA de interferência impede o crescimento normal de Xoo e diminui o tamanho das lesões causadas em folhas de arroz pela bactéria (Yang et al., 2006). Isso indica que Xoo promove susceptibilidade em arroz através de *pthXo1*, que ativa a transcrição do “gene de

susceptibilidade” *Os8N3*. Nesse caso, também resta saber se ocorre interação direta entre o produto do gene *pthXo1* e o promotor de *Os8N3*. Mais recentemente, foi reportado que os genes *pthXo6* e *pthXo7* da família *avrBs3/pthA* de *Xoo* controlam a indução do fator de transcrição tipo bZIP, *OsTFX1*, e da subunidade pequena do factor de transcrição IIA, *OsTFIIA γ 1*, em folhas de arroz, respectivamente. Os autores demonstraram que a perda de virulência devida à falta de *pthXo6* na bactéria pode ser revertida pela expressão ectópica de seu alvo no hospedeiro, *OsTFX1*. Esses dados destacam como a expressão gênica no hospedeiro, manipulada pela família gênica *avrBs3/pthA*, contribui com a virulência do patógeno através do aumento na susceptibilidade do hospedeiro (Sugio et al., 2007).

1.5- Análises transcricionais durante interações planta – patógeno

Antes do advento dos micro arranjos de DNA para análises transcricional em larga escala, outras técnicas como hibridização diferencial de bibliotecas de cDNA (Jung e Hwang, 2000), “display diferencial” de PCR (Yoda et al., 2002; Liang and Pardee, 1992) e amplificação de fragmentos com tamanhos poli mórficos (AFLP) (Marois et al., 2002) levaram a identificação de vários genes de plantas com expressão precoce e associados às respostas de hipersensibilidade ou patogenicidade durante as interações planta - patógeno. Igualmente, a técnica chamada de “gene-calling” permitiu identificar cerca de 400 genes diferencialmente expressos em plantas de tomate após infecção por *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Mysore et al., 2002).

Nos últimos anos, análises transcricionais em larga escala revelaram vários mecanismos de resposta de plantas durante interações compatíveis ou incompatíveis (Tao et al., 2003; Thilmony et al., 2006; Cernadas et al., 2008a). Em trabalhos utilizando *Pseudomonas syringae* DC3000 e *Arabidopsis* como modelo experimental, foram descritos mecanismos de supressão de defesa na planta associados com, i) efetores de virulência dependentes do SST3 e, ii) com a produção da toxina Coronatina (Thilmony et al., 2006). Além disso, a similaridade de perfis transcricionais durante interações incompatíveis em *Arabidopsis*, mediadas por diferentes genes de resistência (*RPS2* ou *RPM1*), sugere que mais de um gene R pode ativar vias de transdução de sinal comuns (Tao et al., 2003).

Recentemente, foram reportados dois trabalhos avaliando a expressão gênica diferencial em plantas de citros em resposta à infecção com os patógenos *Xanthomonas axonopodis* e, *Candidatus liberibacter*, agente causal do *Huanglongbing* (Cernadas et al., 2008a; Albrecht and Bowman, 2008). Em conjunto, essas pesquisas apresentam os

primeiros resultados de expressão diferencial em larga escala desenvolvida para plantas de citros em resposta à infecção com bactérias. Embora o *Candidatus* esteja confinado no espaço do floema na planta, a infecção com essa bactéria induz reações em folhas de laranja que, em parte se assemelham com aquelas induzidas por Xac. Cabe destacar neste sentido a indução de genes envolvidos no metabolismo da parede celular e outros que participam na mobilização de carboidratos. Notavelmente, esses trabalhos destacam o grande número de genes de citros desconhecidos ou sem função biológica descrita que respondem durante a infecção das bactérias, fato que deve concentrar a atenção das futuras pesquisas com citros.

2- OBJETIVOS

Capítulo I

Os experimentos descritos neste capítulo tiveram como objetivo principal a análise da expressão gênica em laranja doce após infecção por Xac e Xaa visando à identificação de, i) genes que participam no desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico, hipertrofia e hiperplasia celular, que desempenham um papel importante para a dispersão da bactéria e, ii) genes induzidos por Xaa relacionados com a resposta de defesa que contém o avanço do patógeno em folhas de laranja. Para tanto, três estratégias independentes foram abordadas:

- a) Hibridação subtrativa suprimida a partir de amostras 48 hai.
- b) *Display* diferencial de PCR a partir de amostras 48 hai.
- c) Microarranjos de DNA usando lâmina comercial de citros com amostras preparadas a 6 e 48 hai. Dita lâmina de citros contém 30.171 probe sets (oligo nucleotídeos) que representam cerca de 24.400 unigenes (Martinez-Godoy et al., 2008) obtidos a partir de varias espécies e híbridos de citros.

A seguir, confirmou-se a expressão diferencial dos genes isolados durante a primeira parte do projeto através de hibridação *Northern* e PCR quantitativo em tempo real.

Capítulo II

Examinar o efeito da aplicação exógena de auxina ou giberelina sobre a expressão de genes, i) envolvidos no metabolismo da parede celular, ii) transporte e sinalização de auxina e, iii) biosíntese de giberelina.

Capítulo III

Isolar e caracterizar regiões promotoras de genes que são induzidos precocemente durante a infecção com *Xanthomonas*.

CAPITULO I

Análise da expressão gênica diferencial de folhas de laranja doce em resposta a *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*

O capítulo I desta Tese contém uma investigação detalhada da expressão gênica em folhas de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) em resposta às bactérias causadoras do cancro cítrico. Este trabalho apresenta-se em formato de artigo científico tal como foi publicado na revista *Molecular Plant Pathology* (Cernadas et al., 2008a). Várias tabelas adjuntas como “*supporting material*” agrupam os genes que foram especificamente modulados por Xac ou Xaa, assim como aqueles que são regulados pelas duas bactérias (Tabelas S2 a S9).

Os genes diferencialmente expressos que foram isolados através de DD PCR ou SSH e validados por PCR em tempo real aparecem na Tabela S1.

Além disso, descrevem-se neste capítulo as primeiras etapas de experimentos de duplo híbrido em leveduras, os quais atualmente estão sendo desenvolvidos em nosso laboratório. Inicialmente, foi realizada a construção de uma biblioteca de cDNA de folhas laranja doce contendo aproximadamente 600 mil clones. Utilizou-se o principal efector de virulência de Xac (PthA) como “isca” para realizar a varredura dessa biblioteca. Aqui se relatam algumas “presas” que foram isoladas nas primeiras varreduras da biblioteca com a proteína PthA.

Um resultado de grande interesse é o acúmulo de mRNA correspondente à uma protease a cisteína durante a situação de susceptibilidade na planta, isto é tanto na laranja doce em resposta a Xac quanto no limão galego em resposta a Xaa ou Xac (Figura S2). Notavelmente, esse gene não é induzido durante a resposta de defesa e parece ser um dos alvos do efector de virulência PthA na planta.

Paralelamente a esses resultados, apresenta-se também a identificação de duas variantes distintas de PthAs, provenientes do isolado 434 de Xaa. Hipotetizamos que o diferencial de patogenicidade entre Xac e Xaa em laranja doce pode estar relacionado com a presença de diferentes variantes de PthAs nas duas bactérias.

ARTIGO CIENTÍFICO:

Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*

RAÚL ANDRÉS CERNADAS, LUCIANA RODRIGUES CAMILLO AND CELSO EDUARDO BENEDETTI

MOLECULAR PLANT PATHOLOGY (2008) **9** (5), 609–631

Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*

RAÚL ANDRÉS CERNADAS, LUCIANA RODRIGUES CAMILLO AND CELSO EDUARDO BENEDETTI*

Center for Molecular and Structural Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

SUMMARY

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* pathotype C (Xaa) are responsible for citrus canker disease; however, while Xac causes canker on all citrus varieties, Xaa is restricted to Mexican lime, and in sweet oranges it triggers a defence response. To gain insights into the differential pathogenicity exhibited by Xac and Xaa and to survey the early molecular events leading to canker development, a detailed transcriptional analysis of sweet orange plants infected with the pathogens was performed. Using differential display, suppressed subtractive hybridization and microarrays, we identified changes in transcript levels in approximately 2.0% of the ~32 000 citrus genes examined. Genes with altered expression in response to Xac/Xaa surveyed at 6 and 48 h post-infection (hpi) were associated with cell-wall modifications, cell division and expansion, vesicle trafficking, disease resistance, carbon and nitrogen metabolism, and responses to hormones auxin, gibberellin and ethylene. Most of the genes that were commonly modulated by Xac and Xaa were associated with basal defences triggered by pathogen-associated molecular patterns, including those involved in reactive oxygen species production and lignification. Significantly, we detected clear changes in the transcriptional profiles of defence, cell-wall, vesicle trafficking and cell growth-related genes in Xac-infected leaves between 6 and 48 hpi. This is consistent with the notion that Xac suppresses host defences early during infection and simultaneously changes the physiological status of the host cells, reprogramming them for division and growth. Notably, brefeldin A, an inhibitor of vesicle trafficking, retarded canker development. In contrast, Xaa triggered a mitogen-activated protein kinase signalling pathway involving WRKY and ethylene-responsive transcriptional factors known to activate downstream defence genes.

INTRODUCTION

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xaa) are bacterial pathogens responsible for citrus canker, a disease that seriously affects commercial citrus varieties worldwide (Shubert *et al.*, 2003). Xac causes the most damaging 'Asiatic' or type A canker on a wide range of citrus species, including sweet oranges (*Citrus sinensis*), grapefruits (*Citrus paradisi*) and lemons (*Citrus limon*). Xaa, by contrast, has a narrower range of citrus hosts and is responsible for the B and C types of canker, which are restricted to some citrus-producing areas in South America (Shubert *et al.*, 2003). The C strains of Xaa are exclusively found in Brazil and are limited to Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) cultivars (Brunings and Gabriel, 2003; Coletta-Filho *et al.*, 2006; Shubert *et al.*, 2003). In addition, pathotype C strains induce a hypersensitive response (HR) in various citrus species including sweet oranges (Brunings and Gabriel, 2003).

The disease symptoms caused by Xac and Xaa on susceptible plants are in general very similar and include the formation of water-soaked eruptions and pustule-like lesions on the surface of leaves, stems and fruits (Shubert *et al.*, 2003). Some of these symptoms are attributed to the phenomenon of cell enlargement (hypertrophy) and division (hyperplasia) that occurs in the host tissues upon infection. This eventually leads to a rupture of the epidermis, which significantly favours pathogen spreading and disease dissemination (Brunings and Gabriel, 2003; Wichmann and Bergelson, 2004).

The molecular mechanism by which Xac and Xaa induce lesions and rupture of the host epidermis is not entirely clear; nevertheless, it has been shown that members of the PthA/AvrBs3 family of effector proteins are required to elicit cankers on citrus (Swarup *et al.*, 1992). Significantly, transient expression of *pthA* was sufficient to promote hypertrophy and hyperplasia in host cells (Duan *et al.*, 1999).

PthA/AvrBs3 proteins are delivered by the type III secretion (TTS) system into the host cells, where they suppress host defences (Fujikawa *et al.*, 2006) and are targeted to the nucleus to modulate transcription of host genes (Marois *et al.*, 2002). In the interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

* Correspondence: Tel.: 55 19 35121111; Fax: 55 19 35121006; E-mail: celso@lnls.br

(Xcv) and pepper plants, AvrBs3 directly activates transcription of a basic helix–loop–helix factor that controls cell enlargement (Kay *et al.*, 2007), a typical response induced by Xcv that resembles the citrus hyperplastic canker. Interestingly, AvrBs3 also mediated promoter activation of its cognate resistance gene in the incompatible interaction (Römer *et al.*, 2007). In citrus plants, however, the early transcriptional changes that occur in response to Xac or Xaa infection remain unknown. Thus, to gain insights into the molecular mechanisms involved in Xac/Xaa-induced hypertrophy and hyperplasia, and to understand the basis of the resistance reaction observed in sweet orange infected with Xaa, a systematic analysis of gene expression in response to these pathogens was conducted. By means of differential display (DD) and suppressed subtractive hybridization (SSH) we identified and categorized 100 genes from *C. sinensis* implicated in canker development and disease resistance. Furthermore, with the recent availability of commercial citrus arrays, a more complete transcriptional profiling of orange leaves infected with the canker pathogens was performed and a clearer picture of transcript alterations emerged. These analyses not only revealed significant transcriptional changes associated with resistance and canker symptom development, but also pointed to a great overlap with gene expression patterns associated with both innate immunity and gene-for-gene resistance mechanisms described for other plant–pathogen interactions (Navarro *et al.*, 2004; Truman *et al.*, 2006). To our knowledge, this is the first description of a detailed global gene expression analysis on citrus plants in response to bacterial pathogens.

The transcriptional change profiling described here may be exploited for future development of citrus plants resistant to Xac.

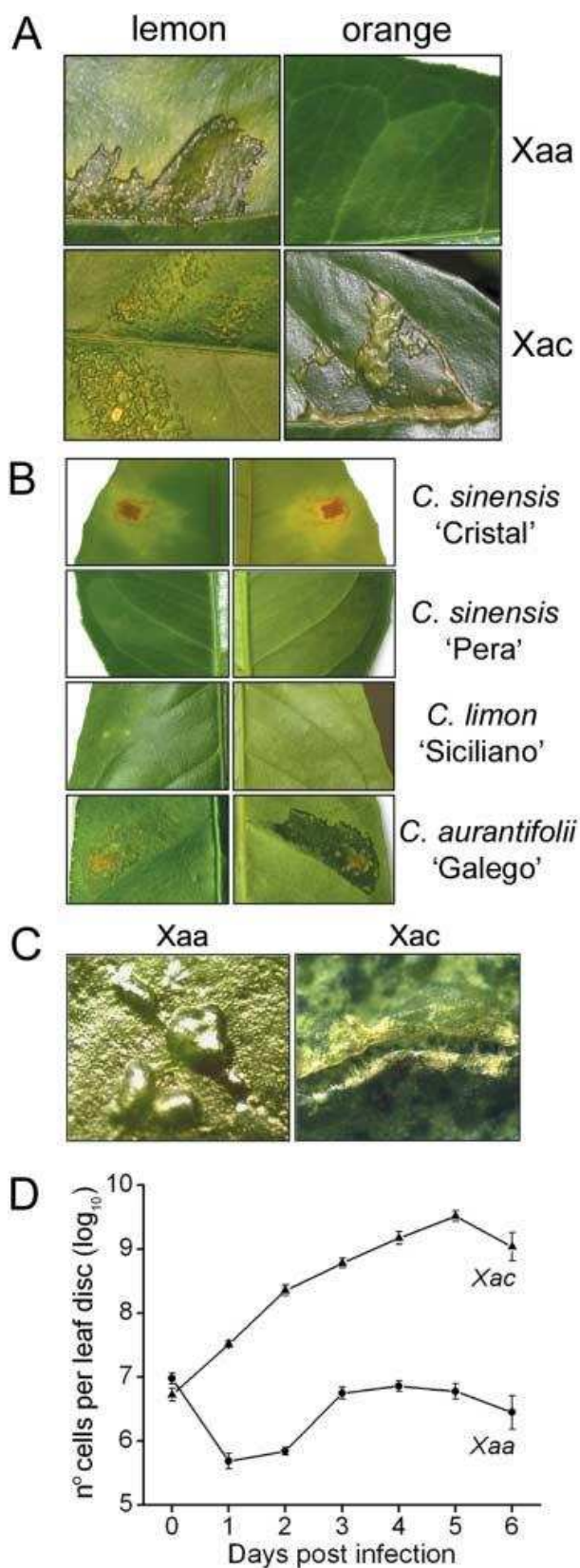
RESULTS AND DISCUSSION

Differential pathogenicity of Xac and Xaa on citrus cultivars

While Xac causes cankers on sweet orange Pêra and Mexican lime cultivars, Xaa pathotype C produces hyperplastic lesions only in Mexican lime whereas in Pêra leaves it induces a type of resistance response that visually appears as a slight yellowing at the site of bacterial infiltration, 5–10 days post-infection (Fig. 1A). The resistance response observed in Pêra leaves upon

Fig. 1 Differential pathogenicity of Xac and Xaa on *Citrus* cultivars.

(A) Leaves of sweet orange and Mexican lime infiltrated with suspensions of Xac or Xaa showing absence of water-soaked lesions or hyperplastic cankers in orange leaf infiltrated with Xaa. Pictures were taken 10 days after bacterial infiltration. (B) Typical HR induced by Xaa in the sweet orange 'Cristal' cultivar compared with the reaction observed in the Pêra or the *C. limon* 'Siciliano' cultivars. Canker symptoms induced by Xaa in Mexican lime 'Galego' are shown for comparison. Pictures were taken 8 days after bacterial infiltration. (C) Micropustules (100× magnification) induced by Xaa on sweet orange relative to the hyperplastic lesion with rupture of the epidermis caused by Xac. (D) Bacterial growth curves *in planta* showing absence of Xaa exponential growth on Pêra leaves.



(D) Bacterial growth curves *in planta* showing absence of Xaa exponential growth on Pêra leaves.

Xaa infection does not appear to be a typical HR as we normally see with other sweet orange varieties (Fig. 1B), or to be what has been generally reported for an Xaa–sweet orange interaction (Brunings and Gabriel, 2003). For instance, tissue necrosis or cell death at the site of bacterial infiltration is not clearly observable. In contrast, close inspection of the Xaa-infiltrated leaf sectors remarkably revealed the presence of micropustules on one side of the epidermis, suggesting the initiation of hyperplastic canker (Fig. 1C). These micropustules appeared much later after Xaa infiltration and, as far as we could observe, they did not lead to rupture of the epidermis, as compared with the hyperplastic pustules induced by Xac, which typically develop within 5–10 days post-infection, under our experimental conditions (Fig. 1C).

To investigate this differential response further, we followed the growth of Xac and Xaa in Pêra leaves and we observed that while Xac grows vigorously after being infiltrated, Xaa does not grow exponentially; nevertheless, a stable number of cells remain alive for at least 6 days after bacterial infiltration (Fig. 1D). This pattern of *in planta* growth is more characteristic of a non-pathogenic invader. Thus, it appears that Xaa has either lost its ability to elicit full canker symptoms on Pêra plants or is evolving to become a pathogen to this cultivar. Hence, we found the Xaa–Pêra interaction an interesting pathosystem to study the citrus defence response at the molecular level, as the development of canker symptoms is aborted at some stage during infection, relative to the compatible Xac–Pêra interaction.

To gain insights into the molecular mechanisms involved in the differential pathogenicity of Xac and Xaa, we monitored the transcriptional changes in Pêra plants in response to these bacteria to identify the genes associated with the early events leading to canker and the resistance reaction, respectively. As Xac appears to induce cell division in citrus within 72 h of inoculation (Brunings and Gabriel, 2003), and the virulence effector PthA is capable of significantly suppressing a defence response as early as 12 h post-infection (hpi), as shown in tobacco (Fujikawa *et al.*, 2006), we analysed the transcriptional changes in sweet orange at 6 and 48 h after Xac/Xaa infiltration.

Identification and classification of orange genes modulated in response to Xac/Xaa infection

Early transcriptional changes that occur in orange leaves in response to Xac or Xaa infection were studied by three independent methods (DD, SSH and microarray) and the expression levels of a significant number of differentially expressed genes were verified by quantitative reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR) and Northern blotting. Using DD and SSH, we identified 120 orange genes with altered expression between Xac- and Xaa-infiltrated leaves. The expression levels of 75% of these genes, measured by qRT-PCR at 48 hpi, confirmed their differential expression relative to water-infiltrated leaves (Supporting Information Table S1). BLAST

searches revealed that most of these messages showed significant identities to known plant genes, which enabled us to categorize them by function (Table S1).

Using the *Citrus* genechip array from Affymetrix, the expression changes of approximately 32 000 citrus expressed sequence tags (ESTs) were analysed at 6 and 48 hpi (Supporting Information Tables S1–S9). Genes were considered as up- or down-regulated when their expression levels were equal or higher than a 3.0-fold increase/decrease relative to water-infiltrated leaves. However, in Xac versus Xaa comparisons, a ≥ 2.0 -fold change cutoff was used to retain a substantial number of genes that were highly up- or down-regulated by the pathogens in respect to water but which showed fold changes lower than 3.0 in Xac versus Xaa analyses (compare fold changes between Xac and Xaa in Tables S8 and S9).

On average, the microarray analyses revealed significant changes in mRNA levels in approximately 2% of the probesets. The corresponding citrus genes were also functionally classified according to their similarity to genes of known function in plants and other organisms and good correlation was found between the gene categories identified by DD/SSH and microarray, as well as between the two microarray datasets of 6 and 48 hpi (Tables S1–S9). As expected, the microarray analyses identified a much greater number of differentially expressed genes but not as many additional functional classes, as compared with DD and SSH. Significantly, nearly half of the genes identified by DD/SSH found no matches to probesets represented in the citrus array, and those that perfectly matched probesets showed expression levels comparable with the levels determined by microarray analysis (Table S1). Thus, the three approaches were complementary and a high level of consistency was observed in the gene expression levels determined by microarray, qRT-PCR and Northern blotting.

Citrus genes with altered expression in response to Xac or Xaa infection were functionally classified into the following categories: cell-wall synthesis and remodelling, terpene and gibberellin (GA) synthesis, auxin signalling and mobilization, vesicle trafficking, disease resistance and defence, cell division and morphogenesis, ethylene synthesis and signalling, retroelement and transposition, carbohydrate and nitrogen metabolism, and putative transcriptional factors. A substantial number of genes were categorized as unknown/hypothetical or 'no hit' (Fig. 2 and Tables S1–S9).

Cell-wall remodelling and structural proteins

One of the major differences in the transcriptional profiling between Xac- and Xaa-infected leaves was observed in the cell-wall metabolism (Fig. 2). At 48 hpi, Xac strongly up-regulated several cell-wall-remodelling enzymes similar to endoglucanases, glycosylhydrolases, pectatylases, pectinesterases and cell-wall proteins such as expansins, extensins and arabinogalactan proteins, known to be induced in tissues undergoing rapid expansion or during pericarp softening and fruit ripening (Li *et al.*, 2003;

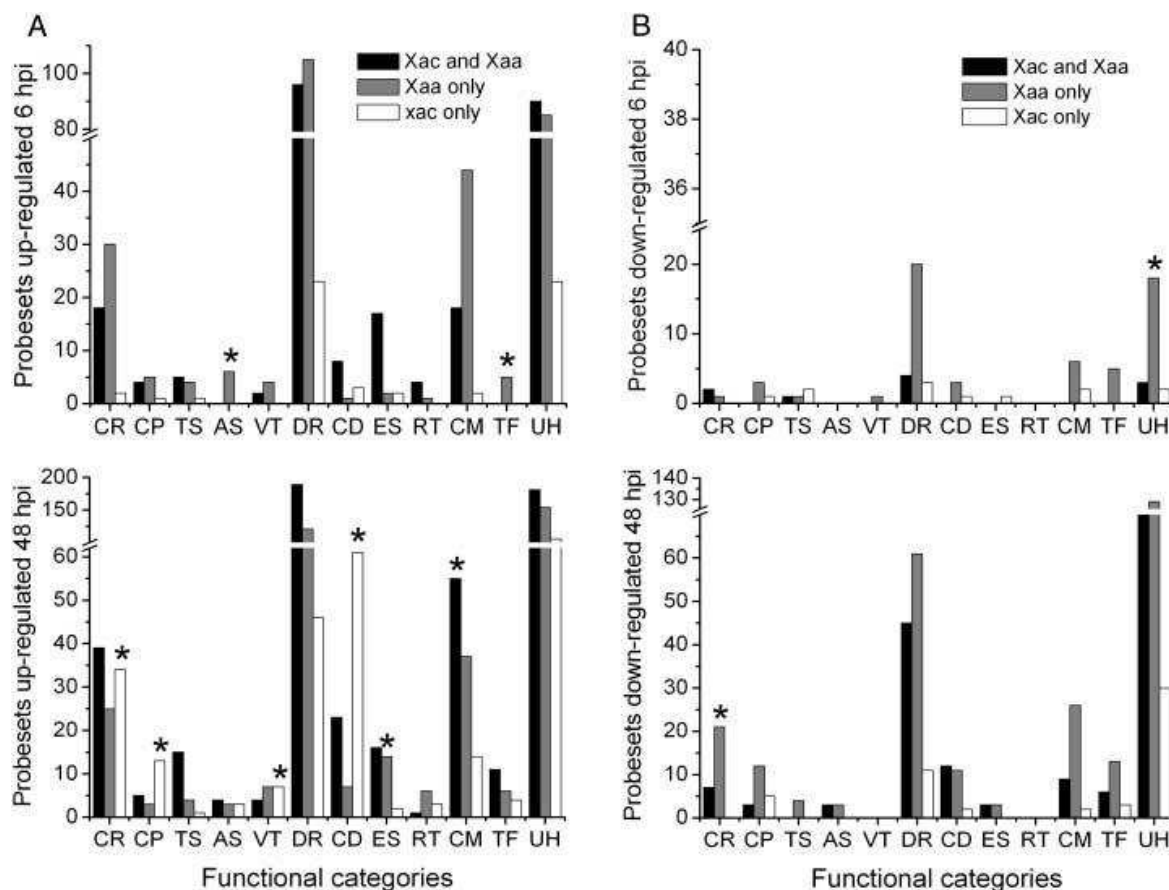


Fig. 2 Distribution and abundance of sweet orange genes modulated by Xac and Xaa in the different functional categories: cell-wall remodelling (CR), cell-wall proteins (CP), terpene and gibberellin synthesis (TS), auxin mobilization and signalling (AS), vesicle trafficking (VT), disease resistance and stress response (DR), cell division and morphogenesis (CD), ethylene synthesis and signalling (ES), retroelement and transposition (RT), carbohydrate and nitrogen metabolism (CM), transcriptional factors (TF) and unknown/hypothetical (UH). The graphics illustrate the number of probesets that were up- (A) or down- (B) regulated by the pathogens with a fold change equal or higher than 3, relative to water-infiltrated leaves. Major transcriptional changes between the 6- and 48-hpi treatments are indicated by asterisks.

Trainotti *et al.*, 1999). Xaa, by contrast, preferentially up-regulated a number of genes related to endoglucanase inhibitors and various *O*-methyltransferases, lacases, hydroxyproline-rich glycoproteins and enzymes of the phenylpropanoid biosynthetic pathway, most of which have been shown to play a central role in cell wall cross-linking and lignification (Ender *et al.*, 2002; Eudes *et al.*, 2006; Goujon *et al.*, 2003). Xaa also down-regulated various cell-wall-modifying and structural proteins whereas Xac down-regulated two proteins related to animal periaxin and cadherin, involved in cell adhesion (Straub *et al.*, 2003) (Table 1 and Supporting Information Tables S1–S4).

Some of these genes were also identified by DD and SSH and their expression levels measured by qRT-PCR are in agreement with the levels determined by microarray (Tables 1 and S1). In addition, Northern blot analysis confirmed the differential expression of some cell-wall-remodelling enzymes between Xac and Xaa treatments (Supporting Information Fig. S1).

The transcriptional changes associated with cell-wall metabolism were perceived earlier during infection, particularly after Xaa treatment (Fig. 2B). Increased expression of genes homologous to specific lignin biosynthesis enzymes including caffeic *O*-methyltransferases, cinnamate 4-hydroxylase and cinnamoyl CoA reductases (Eudes *et al.*, 2006; Goujon *et al.*, 2003; Kawasaki *et al.*, 2006) and cell-wall cross-linking proteins similar to pterophorins were detected at 6 h after Xaa infection (Table 1 and Supporting Information Tables S5–S7).

When we analysed the genes that were commonly regulated by the pathogens we noticed that Xac also induced some genes related to lignin biosynthesis, but at much lower levels than Xaa (Tables S8 and S9). In addition, among the cell-wall-remodelling genes regulated by both bacteria, we observed that Xac up-regulated an alpha-expansin (CK934531, CF837795) that was repressed by Xaa, whereas Xaa up-regulated the periaxin-like protein (CN183059) repressed by Xac (Tables 1 and S9).

Table 1 Major cell-wall proteins and remodelling enzymes modulated by Xac and/or Xaa at 6 and 48 hpi, relative to water-infiltrated leaves. The expression levels of genes identified by DD/SSH were determined by qRT-PCR. Negative numbers represent down-regulation. The complete list of cell-wall remodelling genes modulated by Xac/Xaa is found in Supporting Information Tables S1–S9. Fold change values of Xac versus Xaa treatments are shown for comparison.

Target description	Citrus	Target	Change after treatments							
			Microarray						DD/SSH	
			6 hpi			48 hpi			48 hpi	
	EST	Gene ID	Xaa	Xac	Xac/Xaa	Xaa	Xac	Xac/Xaa	Xaa	Xac
Cell-wall synthesis and remodelling										
Acidic cellulase [<i>C. sinensis</i>]	CF831790	AAB65155	—	—	—	—	36.8	34.8	1.4	8.0
Basic cellulase [<i>C. sinensis</i>]	CX663293	AAB65156	—	—	—	—	13.8	15.3	1.7	18.2
Endo-beta-1,4-glucanase [<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>]	CV887291	CAC94006	—	—	—	—	13.8	21.6	1.3	35.8
Xyloglucan endo-1,4-beta-D-glucanase [<i>T. majus</i>]	CN182557	T10523	—	—	—	—	8.7	15.5	—	—
Beta-D-glucosidase [<i>G. hirsutum</i>]	CX667827	AAQ17461	—	—	—	—	8.4	10.1	—	—
Xyloglucan endotransglycosylase [<i>B. pendula</i>]	CX076871	ABB72441	—	4.0	—	—	7.9	2.3	—	—
Glycosyl transferase family 2 protein [<i>A. thaliana</i>]	CV709535	NP_197666	—	—	—	—	19.1	17.8	—	—
Alpha-D-xylosidase [<i>T. majus</i>]	CV710106	CAA10382	—	—	—	—	11.6	6.2	—	—
Pectate lyase family protein [<i>A. thaliana</i>]	CK933446	NP_563715	—	—	—	—	18.7	32.5	—	—
PS60 pectinesterase [<i>N. tabacum</i>]	CF653190	CAA65634	—	—	—	—	20.4	8.7	1.7	22.6
Cellulose synthase-like OsCslE1 [<i>O. sativa</i>]	CX071539	BAD46391	—	—	—	4.1	—	−2.2	—	—
Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase [<i>C. sinensis</i>]	CB291815	T10119	—	—	—	24.2	—	−8.9	6.3	2.1
O-methyltransferase [<i>P. balsamifera</i> × <i>P. deltoides</i>]	CX302017	AAF60951	12.9	—	−12.5	—	—	—	—	—
Caffeic acid O-methyltransferase [<i>R. chinensis</i>]	CK665535	BAC78828	4.5	—	—	—	—	—	—	—
Caffeic acid 3-O-methyltransferase [<i>C. annuum</i>]	AJ489039	Q9FQY8	8.7	—	−3.5	—	—	—	—	—
Lignin bispecific methyltransferase [<i>P. tremuloides</i>]	CX302051	CAA44006	3.5	—	—	—	—	—	—	—
Cinnamate 4-hydroxylase [<i>Citrus</i> × <i>paradisii</i>]	CK932830	AAK57011	3.9	—	−2.2	—	—	—	—	—
Cinnamoyl CoA reductase-like protein [<i>A. thaliana</i>]	CV706284	AAM62926	3.4	—	—	—	—	—	—	—
Cinnamyl alcohol dehydrogenase [<i>Prunus mume</i>]	CX667871	BAE48658	3.0	—	—	—	—	—	—	—
Phenylalanine ammonia-lyase [<i>C. limon</i>]	CD575471	Q42667	4.6	—	—	—	—	—	—	—
Shikimate kinase family protein [<i>A. thaliana</i>]	CN191392	NP_565393	3.2	—	—	—	—	—	—	—
Polygalacturonase-inhibiting protein [<i>C. jambhiri</i>]	CF828981	BAB78473	4.5	—	−2.0	—	—	—	—	—
Xyloglucanase-specific inhibitor [<i>L. esculentum</i>]	CF833518	AAN87262	6.2	—	−4.2	—	—	—	—	—
Xyloglucanase inhibitor [<i>S. tuberosum</i>]	CX302610	AAP84703	4.6	—	−2.6	5.0	—	−2.7	—	—
Glycoside hydrolase/polygalacturonase [<i>A. thaliana</i>]	CX305641	NP_567055	3.0	—	—	3.4	—	—	—	—
Beta-galactosidase [<i>C. sinensis</i>]	CX043592	AAK31801	8.0	—	−3.0	4.2	—	—	—	—
Cinnamate 4-hydroxylase CYP73 [<i>C. sinensis</i>]	AF255013	AAF66065	3.0	—	−2.0	4.5	—	—	—	—
Catechol O-methyltransferase [<i>N. tabacum</i>]	CX670983	CAA50561	—	—	−6.6	6.9	—	−6.7	—	—
Caffeic acid O-methyltransferase II [<i>N. tabacum</i>]	CX045519	AAL91506	—	—	−4.5	4.8	—	−3.0	—	—
Laccase/diphenol oxidase [<i>A. thaliana</i>]	CF836861	NP_187533	—	—	—	8.5	—	−5.0	—	—
Glycosyl hydrolase family 38 protein [<i>A. thaliana</i>]	CX671694	NP_201416	—	—	—	5.1	—	−2.0	—	—
Glucosyltransferase-1 [<i>V. angularis</i>]	CN187784	BAB86919	—	—	—	−4.1	—	—	—	—
UDP-glycosyltransferase [<i>J. curcas</i>]	CX075207	AAL40272	—	—	—	−3.4	—	—	—	—
Xyloglucan endo-transglycosylase [<i>C. papaya</i>]	CX666073	AAK51119	—	—	—	−3.5	—	—	—	—
Polygalacturonase [<i>A. thaliana</i>]	CF417542	AAM91193	—	—	—	−3.4	—	—	—	—
Pectinacetylase [<i>A. thaliana</i>]	CX069783	AAO50621	—	—	—	−3.4	—	—	−5.0	−2.5
Cell-wall proteins										
Expansin [<i>C. sinensis</i>]	DN958759	ABG49444	—	—	—	—	16.0	8.1	2.6	91.2
Expansin [<i>P. communis</i>]	CX545018	BAC67193	—	—	—	—	19.6	10.8	—	—
Expansin [<i>P. cerasus</i>]	CV710432	AAK48848	—	—	—	—	15.9	17.3	—	—
Alpha-expansin 3 [<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>]	CK934531	AAR09170	—	—	—	−4.3	5.2	9.5	—	—
Arabinogalactan-protein; AGP [<i>P. communis</i>]	CD574246	AAB35283	—	—	—	—	49.4	41.0	—	—
Cim1 protein [<i>G. max</i>]	CX667721	S48032	—	—	—	—	38.4	47.0	—	—
Proline-rich protein [<i>N. glauca</i>]	CK701597	AAF28387	—	—	—	—	9.6	6.9	—	—
Cell-wall protein Exp4 precursor [<i>M. jalapa</i>]	CX640971	AAL87023	—	—	—	—	14.0	11.2	—	—
Fiber protein E6 [<i>G. barbadense</i>]	CK934786	S65063	—	—	—	—	9.2	10.2	—	—
Periaxin-like protein [<i>A. thaliana</i>]	CN183059	CAB89377	3.0	—	—	—	−6.2	−12.6	—	—
Proline-rich protein PRP1 [<i>C. sativa</i>]	CF829030	AAK25755	7.8	—	−2.9	—	—	—	—	—
Pherophorin-dz1 protein [<i>V. carteri</i>]	CX047057	CAD22154	7.8	—	−3.6	—	—	—	—	—
Prolyl 4-hydroxylase [<i>N. tabacum</i>]	CF831203	BAD07294	—	—	—	3.3	—	—	—	—
Beta-expansin 2 (AtEXPB2) [<i>A. thaliana</i>]	CX641267	Q9SHY6	—	—	—	−3.0	—	—	—	—
Fasciclin-like AGP 11 [<i>P. alba</i> × <i>P. tremula</i>]	CX051837	AAT37954	—	—	—	−4.3	—	—	—	—
Arabinogalactan protein [<i>G. hirsutum</i>]	CK701267	AAO92753	—	—	—	−3.4	—	−2.1	—	—

Table 2 Major transcriptional changes in terpene and GA synthesis, auxin mobilization and signalling genes induced by Xac and/or Xaa at 6 and 48 hpi, relative to water-infiltrated leaves. Genes identified by DD/SSH not represented in the citrus array are shown in bold and their expression levels were determined by qRT-PCR. Negative numbers represent down-regulation. The complete list of terpene and GA synthesis, auxin mobilization and signalling genes with altered expression upon Xac/Xaa infection is found in Supporting Information Tables S1–S9.

Target description	Citrus	Target	Change after treatments					
			Microarray				DD/SSH	
			6 hpi		48 hpi		48 hpi	
Terpene, GA and volatile synthesis	EST	Gene ID	Xaa	Xac	Xaa	Xac	Xaa	Xac
GGPP synthase [<i>D. carota</i>]	CX669501	BAA78047	7.5	—	28.8	40.6	—	—
Geranyl diphosphate synthase [<i>A. majus</i>]	CX290062	AAS82859	—	—	3.0	14.8	—	—
HGG transferase [<i>V. vinifera</i>]	CX306825	AAV74623	87.3	30.7	133.7	75.4	—	—
Transferase family protein [<i>A. thaliana</i>]	CF418090	NP 189233	31.3	6.7	17.4	3.3	—	—
Acetyltransferase-like protein [<i>A. thaliana</i>]	CN191360	BAB01067	35.6	9.8	23.0	5.5	—	—
Orcinol O-methyltransferase [<i>Rosa</i> hybrid]	CV714380	AAM23005	3.9	5.2	8.0	5.6	—	—
GHMP kinase family protein [<i>A. thaliana</i>]	CK935595	NP 566144	—	—	6.8	4.7	—	—
LYTB-like protein precursor [<i>A. palaestina</i>]	CF828804	AAG21984	5.3	—	3.0	—	—	—
Linalool synthase [<i>A. thaliana</i>]	CV885575	AAO85533	–8.0	–3.4	—	—	—	—
Cytochrome P450 / DDWF1 [<i>N. tabacum</i>]	CV885042	AAK62346	—	—	23.7	10.6	43.3	19.3
Methylcoclaurine 3'-hydroxylase [<i>E. californica</i>]	DN620712	AF014802	—	—	—	—	2.1	3.0
Terpene synthase [<i>A. thaliana</i>]	—	AF497492	—	—	—	—	3.7	6.9
UbiA prenyltransferase [<i>A. thaliana</i>]	—	NM 112028	—	—	—	—	1.0	3.2
α -Farnesene synthase [<i>Malus</i> $\times$ <i>domestica</i>]	CX044235	AY182241	—	—	—	—	–4.2	3.0
SAM-salicylate methyltransferase [<i>H. carnosol</i>]	CN182915	AJ863118	—	—	—	—	20.0	60.4
PDR-type ABC transporter 1 [<i>N. tabacum</i>]	CX641504	AB109388	—	—	—	—	4.1	2.5
Auxin signaling								
IAA-amino acid conjugate hydrolase [<i>A. thaliana</i>]	CF836363	AAL47552	3.6	—	—	—	—	—
gr1-protein/IAA-amino acid hydrolase [<i>A. thaliana</i>]	CN186513	CAA09330	5.1	—	—	—	—	—
Aux/IAA protein [<i>V. vinifera</i>]	CX306870	AAL92850	—	—	3.8	—	—	—
Nitrilase [<i>N. tabacum</i>]	CX289842	T03736	—	—	3.2	—	—	—
Auxin-induced BLHL factor [<i>G. hirsutum</i>]	CX544672	AAD48836	—	—	–3.1	–2.4	—	—
Aux/IAA protein [<i>P. tremula</i> $\times$ <i>P. tremuloides</i>]	CX301300	CAC84710	—	—	–3.8	–2.9	—	—
Rhodanese-like family protein [<i>A. thaliana</i>]	CK936971	AAM64600	–2.2	—	–3.2	–2.7	—	—
Auxin efflux carrier family protein [<i>A. thaliana</i>]	CN187762	NP 683316	4.0	—	15.7	6.2	—	—
GH3.1/IAA synthetase [<i>A. thaliana</i>]	CV714093	AAC61292	3.9	—	7.4	4.9	—	—
Nt-gh3 deduced protein [<i>N. tabacum</i>]	CF837443	AAD32141	3.6	—	5.3	4.3	—	—
Auxin-induced protein Aux22 [<i>V. radiata</i>]	DN799130	T10941	—	—	–4.6	–4.1	—	—
Nt-iaa4.5 deduced protein [<i>N. tabacum</i>]	CK934325	AAD32145	—	—	–3.9	–4.2	—	—
Putative microRNA167	CK936755	—	—	—	–6.7	–4.0	—	—
Multidrug resistance/P-glycoprotein [<i>A. thaliana</i>]	CX306117	NM 116080	—	—	3.6	3.3	3.0	2.0
NAC domain protein NAC6 [<i>G. max</i>]	DN619712	DQ028774	—	—	—	2.1	1.8	4.5
ER lumen-retaining receptor [<i>A. thaliana</i>]	CX676252	AY086280	—	—	—	—	2.0	2.2
ADP-ribosylation factor [<i>C. annuum</i>]	DR908238	AF108891	—	—	—	—	1.7	2.7

Terpene and GA synthesis

Various citrus genes encoding proteins similar to terpene synthase, geranylgeranyl diphosphate synthase, homogenisate geranylgeranyl transferase, cytochrome P450/DDWF1 and S-adenosyl methionine-salicylate methyltransferase, among others, were strongly up-regulated by both Xac and Xaa at 6 h and 48 h after bacterial infiltration (Table 2 and Supporting Information Tables S1–S9). These enzymes are known to be involved in the

synthesis and transport of a variety of terpenes, gibberellins, brassinosteroids, alkaloids and plant volatiles, which play diverse roles in plant development and defence (Bird *et al.*, 2003; Mercke *et al.*, 2004; Richman *et al.*, 1999).

Major differences in the transcriptional profiles of terpene and GA synthesis genes were found in the expression of an LYTB-like protein (CF828804) involved in isoprenoid biosynthesis, detected in Xaa treatments only (Tables 2, S4 and S7). Similarly, by DD/SSH we identified a putative UbiA prenyltransferase specifically

up-regulated by Xac, whereas a protein similar to an α -farnesene synthase (CX044235), implicated in defence volatile synthesis (Mercke *et al.*, 2004), was up-regulated by Xac but down-regulated by Xaa (Tables 2 and S1).

Auxin mobilization and signalling

Transcriptional changes in response to Xac and Xaa infection were also observed for a group of genes involved in auxin mobilization, transport and signal transduction. For instance, genes related to GH3-like proteins, nitrilase and IAA (indole-3-acetic acid)–amino acid conjugate hydrolases, involved in auxin synthesis and mobilization (Park *et al.*, 2003; Staswick *et al.*, 2005) were preferentially up-regulated by Xaa, particularly at 6 hpi (Fig. 2A, Table 2 and Supporting Information Tables S1–S9). This is in accordance with the induction of proteins similar to auxin efflux carrier, P-glycoprotein, ER lumen-retaining receptor and ADP-ribosylation factor implicated in the polar flux of auxin in the endoplasmic reticulum and Golgi (Multani *et al.*, 2003; Noh *et al.*, 2001; Zhuang *et al.*, 2005) (Table 2 and Supporting Information Tables S1–S9).

Interestingly, a number of related Aux/IAA proteins and a putative microRNA167 were similarly down-regulated by Xac and Xaa, relative to water-infiltrated leaves. Additionally, a NAM-like protein (DN619712) homologous to NAC transcriptional factors required for auxin and GA signal transduction (Robertson, 2004; Xie *et al.*, 2000) was up-regulated by the pathogens (Tables 2 and S2), suggesting changes in auxin signalling upon *X. axonopodis* infection. As repression of auxin signalling has recently been shown to play a role in antibacterial resistance (Navarro *et al.*, 2004), it is likely that the changes in expression of auxin mobilization and signalling genes described here are associated with canker development. Accordingly, Xcv also induces auxin-responsive genes including expansins, which may be involved in cell enlargement caused by this bacterium in pepper plants (Marois *et al.*, 2002).

Vesicle trafficking

In addition to the genes possibly involved in the polar flux of auxin, we identified several genes related to vesicle trafficking, docking and fusion that were induced by the pathogens mainly at 48 h after bacterial infiltration. For instance, genes encoding proteins homologous to SAR1, Sec1, Sec14, SNAREs, Rab-GTPases, epsin, coatamer and vacuolar-sorting receptor were similarly up-regulated by Xac and Xaa (Tables S1, S8 and S9).

Recent studies have highlighted the importance of polarized vesicle trafficking in plant–pathogen interactions (Hückelhoven, 2007). Transport and secretion of plant materials at the interface of interactions have been associated primarily with non-specific resistance, and syntaxins and ABC transporters play important roles in this process (Hückelhoven, 2007). Interestingly, citrus proteins related to syntaxins and PDR/ABC transporters impli-

cated in secretion of antimicrobial terpenoids (van den Brûle and Smart, 2002) were specifically induced by Xaa. Notably, the citrus EST CX304749 is homologous to syntaxin SYP132, a novel component of effector-triggered immunity that contributes to plant resistance against bacteria and secretion of pathogenesis-related (PR) proteins (Kalde *et al.*, 2007). By contrast, some genes related to SNAREs, Rab-GTPases, SAR1, patellin and annexins were specifically up-regulated by Xac (Tables S2–S7). Particularly, the gene BQ624283 is similar to NPSN11, a cell plate-associated SNARE protein that is highly expressed in dividing cells and interacts with KNOLLE, a cytokinesis-specific syntaxin (Zheng *et al.*, 2002). Thus, although polar vesicle trafficking has been generally implicated in new cell-wall appositions for basal defence, the up-regulation of an NSP11-like protein in Xac-infected leaves suggests a link with the hyperplasia of canker lesions. This idea is supported by the fact that the number of vesicle trafficking, cell division and cell-wall remodelling genes up-regulated by Xac increased substantially from 6 to 48 hpi (Fig. 2A). Remarkably, brefeldin A, a well-known inhibitor of vesicle trafficking, significantly retarded initial pustule development induced by Xac (Fig. 3), thus indicating that vesicle trafficking in this case is mediating symptom development rather than defence.

Disease resistance, defence and stress responses

The major transcriptional changes after Xac/Xaa infection were observed for genes related to disease resistance, defence and stress responses (Fig. 2). In this functional category we incorporated many citrus ESTs homologous to disease resistance, signal perception, oxidative burst, protein turnover and HR-related genes, most of which have been implicated in the innate immune response or involved in the sensing of PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). However, the expression of genes related to gene-for-gene resistance mechanisms was also altered by the pathogens.

Citrus genes that were induced by both pathogens and are likely to play roles in innate immunity are homologous to CYP450 monooxygenases, peroxidases and oxidases involved in the production of reactive oxygen species (ROS), as well as glutathione-S-transferase (GST), thioredoxins, leucoanthocyanidin dioxygenases, haemoglobins and flavonol synthases, known to counteract pathogen-induced oxidative stress in plants (Reddy *et al.*, 2007). These genes were strongly up-regulated at 6 and 48 hpi (Tables 3, S8 and S9). Notably, at 6 hpi, we detected an elevated expression of ESTs (CX077228, CX296261) homologous to BON1-associated protein BAP1, which has been recently shown to act as a general inhibitor of programmed cell death (Yang *et al.*, 2007). Interestingly, however, these and other citrus ESTs related to copines, BAP1 and BAP2 were found up-regulated by Xaa only at 48 hpi (Tables 3, S2 and S4), suggesting that Xac suppresses programmed cell death early during infection.

Table 3 Principal disease resistance, defence and stress response genes up-regulated by Xac and Xaa at 6 and 48 hpi, relative to water-infiltrated leaves. Genes identified by DD/SSH not represented in the citrus array are shown in bold and their expression levels were determined by qRT-PCR. The complete list of disease resistance, defence and stress response genes with altered expression upon Xac/Xaa infection is found in Supporting Information Tables S1, S8 and S9.

Target description	Citrus	Target	Change after treatments					
			Microarray				DD/SSH	
			6 hpi		48 hpi		48 hpi	
Disease resistance, defence and stress response	EST	Gene ID	Xaa	Xac	Xaa	Xac	Xaa	Xac
Disease resistance protein [<i>A. thaliana</i>]	CX301461	NP 199715	8.7	8.7	19.0	15.3	—	—
Leucine-rich repeat protein [<i>A. thaliana</i>]	CX642531	NP 172219	—	—	6.6	6.5	—	—
Resistance protein RPP8-like protein [<i>A. thaliana</i>]	CX669576	AAP82824	14.0	7.3	5.2	4.7	—	—
Receptor protein kinase [<i>A. thaliana</i>]	CV707423	AAO42089	13.4	9.5	7.6	7.3	—	—
EIX receptor 2 [<i>L. esculentum</i>]	CX043514	AAR28378	—	—	4.4	6.3	—	—
LRR receptor like kinase [<i>A. thaliana</i>]	—	AK221860	—	—	—	—	11.8	14.7
Disease resistance protein [<i>A. thaliana</i>]	—	AC020579	—	—	—	—	3.8	5.6
BON1-associated protein BAP1 [<i>A. thaliana</i>]	CX077288	NP 182100	11.6	19.7	6.1	—	—	—
WRKY-type DNA binding protein [<i>A. thaliana</i>]	CX050828	BAC42556	13.9	6.4	7.5	15.5	—	—
WRKY-type DNA binding protein [<i>A. thaliana</i>]	CF828414	BAC23031	—	—	24.7	7.5	—	—
Zinc finger (C3HC4-type RING finger) [<i>A. thaliana</i>]	BQ623333	NP 565376	3.1	6.1	—	—	—	—
RING-H2 zinc finger protein ATL3 [<i>A. thaliana</i>]	CX050623	AAD33581	4.8	4.7	7.7	4.0	—	—
ZPT2-12 [<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i>]	CK939354	BAA21921	7.4	9.2	—	—	—	—
F-box family protein [<i>A. thaliana</i>]	CK935545	NP 566322	3.4	3.4	7.4	4.9	—	—
Calcium-binding EF hand protein [<i>A. thaliana</i>]	CK939355	NP 568568	3.7	10.0	—	—	—	—
NAC domain protein NAC2 [<i>A. thaliana</i>]	CK940145	AAM63330	11.3	4.5	39.0	7.8	—	—
HSR203J like protein [<i>C. chinense</i>]	CN190145	BAD11070	—	—	13.5	6.4	—	—
Bacterial-induced peroxidase [<i>G. hirsutum</i>]	CX078551	AAD43561	45.1	41.7	36.3	28.4	—	—
Peroxidase [<i>P. nigra</i>]	CF832245	BAA11853	14.6	7.0	9.5	7.5	—	—
Anionic peroxidase H [<i>Z. mays</i>]	CV718839	AAC79953	19.1	5.9	8.3	3.5	—	—
Apoplastic anionic galactol peroxidase [<i>G. hirsutum</i>]	CF835282	AAL92037	36.7	13.6	14.1	6.7	—	—
Peroxidase [<i>P. balsamifera</i>]	CV707821	CAA66037	12.0	4.6	9.4	3.8	—	—
Putative NADH-dehydrogenase [<i>P. sativum</i>]	CX293755	AAO27256	9.7	5.9	13.6	20.8	—	—
Tropinone reductase [<i>A. thaliana</i>]	CX078323	NP 180480	38.3	21.6	—	—	—	—
Tropinone reductase I [<i>S. tuberosum</i>]	CN191155	CAC34420	11.9	12.9	26.7	10.3	—	—
Glutathione S-transferase [<i>C. maxima</i>]	CX297758	BAC21263	48.2	32.6	18.0	21.2	—	—
Respiratory burst oxidase [<i>N. benthamiana</i>]	CX301580	BAC56865	14.0	4.3	12.1	11.3	—	—
Alternative oxidase [<i>P. tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>]	DN795132	CAB64356	4.6	3.5	17.3	3.2	—	—
Cytochrome P450 monooxygenase [<i>A. thaliana</i>]	CX636220	AAM61746	10.1	5.7	—	—	—	—
Cytochrome P450 [<i>C. sinensis</i>]	CX639356	AAL24049	7.3	8.8	43.7	5.7	—	—
Cytochrome P450 79A1 [<i>S. vulgare</i>]	CX296809	Q43135	23.9	13.3	13.6	6.9	—	—
Cytochrome P450 CYP79A2 [<i>A. thaliana</i>]	CB322199	NP 568153	21.6	11.6	17.3	8.3	—	—
Cytochrome P450 [<i>A. thaliana</i>]	CX301598	BAB09969	25.3	11.3	19.2	8.2	—	—
Cytochrome P450 like TBP [<i>N. tabacum</i>]	CB322204	D64052	—	—	—	—	4.2	2.9
Lipase class 3 family protein [<i>A. thaliana</i>]	CN190043	NP 973975	30.4	5.0	79.3	15.8	—	—
Lipoxygenase LOX2 [<i>P. deltoids</i>]	CX671317	DQ131179	—	—	—	—	8.0	4.4
Phospholipase D gamma 1 [<i>A. thaliana</i>]	DN618160	NP 192922	—	—	8.0	5.1	18.9	9.2
Pathogenesis-related protein PR-1 [<i>C. annuum</i>]	CF653559	AAK30143	7.0	4.2	22.7	25.3	187	233
Pathogenesis-related protein 5-1 [<i>H. annuus</i>]	CF836158	AAM21199	39.7	6.2	11.7	10.1	—	—
Pathogenesis-related protein 4b [<i>C. chinense</i>]	CX643738	BAD11073	128.7	13.7	40.7	6.0	—	—
Pathogenesis-related protein 4A [<i>N. tabacum</i>]	CX637285	CAA41437	12.2	4.1	27.6	14.0	—	—
Phenylalanine-ammonia lyase [<i>Citrus</i> sp.]	CX643181	CAB42793	12.0	7.9	21.2	19.5	—	—
Lectin-like protein kinase [<i>A. thaliana</i>]	CX669884	BAB09808	11.0	3.8	39.7	6.3	—	—
Chitinase CHI1 [<i>C. sinensis</i>]	CX292066	AAC35981	3.5	3.2	13.4	24.1	—	—
Chitinase [<i>H. brasiliensis</i>]	CX671223	CAA09110	—	—	7.6	7.7	—	—
Chitinase [<i>G. hirsutum</i>]	CX637693	CAA92277	18.5	3.1	26.3	13.8	—	—
Leucoanthocyanidin dioxygenase [<i>A. thaliana</i>]	CX641508	BAB02603	9.7	6.3	37.2	12.4	—	—
Phytoecyanin homolog [<i>P. taeda</i>]	CF836493	AAF75824	42.7	6.9	—	—	—	—
Dicyanin [<i>L. esculentum</i>]	CX297166	AAF66242	7.0	3.1	27.2	24.5	—	—
Patatin-like protein 1 [<i>N. tabacum</i>]	CX295316	AAF98368	11.0	4.1	—	—	—	—
Ionotropic glutamate receptor GLR4 [<i>O. sativa</i>]	CV710376	XP 478449	4.3	4.5	5.1	4.3	—	—
Wts2L [<i>C. lanatus</i>]	DN620336	BAA89230	4.9	5.2	5.1	3.3	—	—
CPRD2 [<i>V. unguiculata</i>]	CX291051	BAB33033	55.6	9.0	74.4	46.3	—	—
Nectarin 5 [<i>N. langsdorffii</i> × <i>N. sanderiae</i>]	CX299253	AAP30841	84.65	18.65	123.7	106.7	—	—

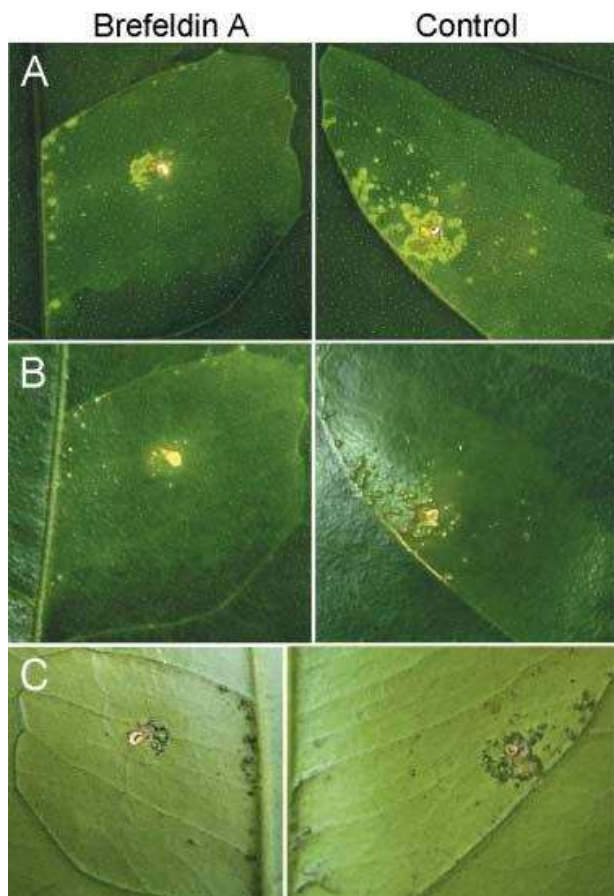


Fig. 3 Effect of brefeldin A on initial formation of canker pustules in Pêra leaves infiltrated with Xac. The number of pustules observed under transmitted light (A) or in the upper (B) and lower (C) surfaces of the leaf are significantly smaller in the leaf sector treated with brefeldin A, compared with control. Clearer zones in A and B correspond to the infiltrated sectors.

We also noticed high expression levels of phenylalanine ammonia lyases (PAL), tropinone reductases and related FAD-linked oxidases (CPRD2 and nectarin 5) similar to berberine bridge enzymes involved in phytoalexin and alkaloid production, as well as increased expression of proteins similar to lipases, jasmonic acid (JA) proteins, PR proteins, chitinases and a phospholipase D implicated in local defence and wound response (Laxalt and Munnick, 2002) (Tables 3, S8 and S9). In addition, the elevated expression of genes homologous to leucine-rich repeat (LRR) proteins, receptor protein kinases, WRKY transcription factors, C3HC4 Ring fingers, F-box and 26S proteasome proteins, NAC/NAM-like proteins, PDR ABC transporters and HSR203, known to play roles in defence (Dong *et al.*, 2006; Eulgem and Somssich, 2007; Oh *et al.*, 2005; van den Brûle and Smart, 2002) strongly suggests that an HR-like reaction is being mounted against both pathogens. Nonetheless, although most of these genes were induced at higher levels by Xaa (Tables 3, S2 and S5), this transcriptional profile would apparently be inconsistent with

the compatible Xac–Pêra interaction. Thus, to find better clues to the differential pathogenicity exhibited by Xac and Xaa in the Pêra cultivar, we looked at the defence-related genes specifically modulated by each pathogen. Not surprisingly, we found that Xac altered the expression of a significantly smaller number of defence-related genes compared with Xaa in both infection treatments (Fig. 2 and Tables S2–S7), a clear indication of suppression of defence responses during canker development. This is in accordance with the fact that the effector protein PthA suppressed non-specific or basal defence responses in a heterologous plant system (Fujikawa *et al.*, 2006).

At 6 hpi, Xac specifically induced the expression of several genes that might be associated with an oxidative stress response, including a WRKY transcriptional factor, GST, S-like RNase and thioredoxin h (Table 4 and Supporting Information Tables S5–S7). Curiously, thioredoxin h was shown to reduce S-RNase in *Nicotiana glauca*, whereas in *Arabidopsis*, a thioredoxin h induced by oxidative stress and *Pseudomonas syringae* infection was regulated by a WRKY factor (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Laloi *et al.*, 2004).

Interestingly, the transcriptional profile of Xac-regulated genes changed significantly from 6 to 48 hpi (Fig. 2A, Table 4 and Supporting Information Tables S2–S4), indicating a change in the physiological status of the host cell, as the infection progressed. At 48 hpi, Xac induced the expression of specific genes encoding putative disease-resistant proteins such as MLO, LysM-domain receptor kinase, cysteine protease (CP), and nodulins. Notably, the MLO, early nodulin and CP homologues were also identified by DD/SSH and their expression levels as measured by qRT-PCR confirmed their predominant responsiveness to Xac infection (Table 4 and Supporting Information Tables S1–S4).

The role of these proteins in disease resistance or canker development is not yet clear; however, it is interesting to note that MLO proteins function as negative modulators of antifungal defences and are associated with vesicle trafficking (Consonni *et al.*, 2006), whereas Lys-domain receptor kinases play crucial roles in the specific recognition of symbiotic bacteria during root nodule formation (Spaink, 2004). This suggests that overexpression of such proteins in citrus leaves might favour disease development rather than resistance. Consistent with this idea, the citrus CP (DN623815) is similar to nodule-specific cysteine proteinases (Naito *et al.*, 2000) and to Rcr3, required for *Clasodoporum fulvum* resistance but also suppression of autonecrosis in tomato (Krüger *et al.*, 2002). Inhibition of Rcr3 activity by *C. fulvum* Avr2 led to an HR reaction (Rooney *et al.*, 2005), suggesting that increased levels of citrus CP might as well be associated with disease susceptibility. This idea is supported by the fact that the citrus CP is overexpressed in Mexican lime in response to both Xac and Xaa infection (Supporting Information Fig. S2).

Xac up-regulated a number of cyclophilin-related peptidylprolyl isomerases and aquaporins, whereas it down-regulated some lipid-transfer proteins and a cysteine endopeptidase (Table 4 and

Table 4 Main disease resistance and defence-related genes specifically regulated by Xac, relative to water treatments. The expression levels of genes identified by DD/SSH were determined by qRT-PCR. Negative numbers represent down-regulation. The complete list of defence-related genes specifically modulated by Xac is found in Supporting Information Tables S3 and S6. Fold change values of Xac versus Xaa treatments are shown for comparison.

Target description	Citrus	Target	Change after treatment					
			Microarray				DD/SSH	
			6 hpi		48 hpi		48 hpi	
Disease resistance, defence and stress response	EST	Gene ID	Xac	Xac/Xaa	Xac	Xac/Xaa	Xaa	Xac
WRKY transcription factor 10 [<i>N. tabacum</i>]	DN799348	CAI38917	9.3	5.3	—	—	—	—
Hypersensitive-induced response protein [<i>O. sativa</i>]	DN798608	XP 450602	5.2	2.7	—	—	—	—
Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 65 [<i>N. tabacum</i>]	DR405210	AAG43557	6.5	2.4	—	2.8	—	—
Calcium-binding protein, putative [<i>A. thaliana</i>]	CX046527	NP 564143	4.2	2.2	—	2.3	—	—
S-like ribonuclease [<i>P. dulcis</i>]	CX044216	AAF82615	4.6	2.6	—	—	—	—
Thioredoxin h [<i>H. brasiliensis</i>]	BQ623844	AAD33596	3.0	3.8	—	—	—	—
Glutathione S-transferase [<i>A. thaliana</i>]	CX293561	AAG30140	4.7	2.2	—	—	—	—
Glutathione S-transferase [<i>A. thaliana</i>]	CX293561	AAG30140	4.7	2.2	—	—	—	—
Lipase/hydrolase, putative [<i>A. thaliana</i>]	CX044184	AAM64368	4.9	2.4	—	—	—	—
Disease resistance protein/LRR protein [<i>A. thaliana</i>]	CN181971	NP 197731	—	—	6.6	7.4	—	—
Leucine-rich repeat protein-related [<i>A. thaliana</i>]	CX303178	NP 564237	—	—	5.2	6.3	—	—
Receptor protein kinase family [<i>A. thaliana</i>]	CF510003	NP 200249	—	—	7.1	3.4	—	—
Putative protein kinase APK1A [<i>Oryza sativa</i>]	CD573725	NP 913119	—	—	5.2	2.9	—	—
Seven transmembrane MLO family protein [<i>A. thaliana</i>]	CK933849	NP 192169	—	—	3.0	3.0	1.0	4.0
LysM-domain GPI-anchored protein 1 [<i>A. thaliana</i>]	CV707862	Q93ZH0	—	—	4.0	2.8	—	—
Peroxidase ATP26a homolog [<i>A. thaliana</i>]	CX048985	BAB10896	—	—	10.9	7.8	—	—
Cysteine protease-like protein [<i>A. thaliana</i>]	DN623815	CAB66413	—	—	4.9	—	1.6	20.2
Putative early nodule-specific protein [<i>A. thaliana</i>]	CV887212	BAC43003	—	—	5.7	6.2	5.2	44.1
Nodulin-like protein [<i>P. trifoliata</i>]	CX671683	AAN62343	—	—	6.1	7.5	—	—
Lipase-related [<i>A. thaliana</i>]	CD574243	NP 564291	—	—	3.8	4.8	—	—
Multi-copper oxidase [<i>A. thaliana</i>]	CX671357	AAN38699	—	2.6	8.5	7.9	—	—
Syringolide-induced protein 19-1-5 [<i>G. max</i>]	CK939135	BAB86890	—	—	3.6	—	—	—
Aquaporin TIP3 [<i>V. berlandieri</i> × <i>V. rupestris</i>]	CX673014	AAF78757	—	2.3	5.0	5.3	—	—
Zinc finger (C3HC4-type RING finger) protein [<i>A. thaliana</i>]	BQ624718	NP 193956	—	—	4.9	5.8	—	—
FAD-linked oxidoreductase [<i>A. thaliana</i>]	CX675564	AAO50720	—	—	19.0	11.1	—	—
Protein disulphide isomerase [<i>E. guineensis</i>]	CN182165	AAO26314	—	—	3.4	—	—	—
70 kDa heat shock protein [<i>P. vulgaris</i>]	CV704678	CAA47345	—	—	3.6	—	—	—
HSP70 [<i>A. thaliana</i>]	CV720046	NP 567510	—	—	3.6	—	—	—
10 kDa chaperonin (CPN10) [<i>A. thaliana</i>]	CV713701	NP 563961	—	—	4.5	—	—	—
Mitochondrial chaperonin-60 [<i>O. sativa</i>]	CX671431	NP 921872	—	—	4.3	—	—	—
Glutaredoxin [<i>A. thaliana</i>]	CX289567	CAB69043	—	—	3.0	—	—	—
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase [<i>A. thaliana</i>]	CK934189	NP 567717	—	—	3.1	—	—	—
Peptidylprolyl isomerase [<i>O. sativa</i>]	CX053295	BAD46607	—	—	3.3	—	—	—
Peroxidase ATP23a [<i>A. thaliana</i>]	CX666965	CAA70035	—	—	−3.2	—	—	—
Glycosylhydrolase/beta-glucosidase [<i>A. thaliana</i>]	CK935993	NP 181976	—	—	−3.1	—	—	—
Cysteine endopeptidase [<i>R. communis</i>]	CO91268	AAC62396	—	—	−3.2	—	—	—
Tropinone reductase [<i>Calystegia sepium</i>]	CN181671	CAD62568	—	2.1	−3.8	—	—	—
Cold-regulated LTCOR12—snakin 2 [<i>L. thuringiaca</i>]	CF837470	AAC15460	—	—	−3.0	—	—	—
Lipid transfer protein [<i>A. thaliana</i>]	CX302649	AAM60950	—	—	−3.4	—	—	—
Non-specific lipid transfer-like protein [<i>P. vulgaris</i>]	CX069746	AAC49370	—	—	−3.1	—	—	—
Protease inhibitor/lipid transfer protein (LTP) [<i>A. thaliana</i>]	CK935516	NP 190966	—	2.0	−3.1	—	—	—
Germin [<i>A. thaliana</i>]	CX663291	AAM61433	—	—	−3.0	—	—	—

Supporting Information Tables S1–S4). The role of such proteins in defence is not clear, although elevated expression of lipid-transfer proteins and cysteine endopeptidase resulted in increased resistance to pathogens (Jayaraj and Punja, 2007) and

programmed cell death (Greenwood *et al.*, 2005), respectively. Increased expression of aquaporins, on the other hand, might be associated with diffusion of ROS across membranes during oxidative stress (Bienert *et al.*, 2006) or with the water soaking

phenomenon that occurs prior to canker development (Brunings and Gabriel, 2003). Interestingly, cyclophilin has been recently shown to activate a bacterial effector protein (Coaker *et al.*, 2005), suggesting that it may be required to properly fold effector proteins after they are delivered into the plant cell. Significantly, we identified a citrus cyclophilin that interacted with PthA in a two-hybrid assay (unpublished results).

As opposed to the expression profiles of defence-related genes in Xac-infiltrated leaves, there was a remarkable overlap between the transcriptional profiles of Xaa-regulated genes of the 6- and 48-h infection treatments (Table 5 and Supporting Information Tables S2–S7). Notably, most of the defence-related genes altered by Xaa have been shown in other plants to be rapidly activated during incompatible interactions or to act in the establishment of HR. For instance, some Xaa-induced genes are similar to MYB transcription factors and HIN1 involved in resistance against bacterial and virus pathogens (Daniel *et al.*, 1999; Fujikawa *et al.*, 2006; Yang and Klessig, 1996), F-box and Ring fingers known to play crucial roles in protein turnover during pathogen attack (Azevedo *et al.*, 2002; Kawasaki *et al.*, 2005), and NAC/NAM transcriptional factors associated with incompatible interactions and stress responses (Hu *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2005) (Table 5 and Supporting Information Tables S2–S7). Xaa also induced the expression of several genes related to protein kinases implicated in defence, including a homologue of the rice XA21 (Table 5), a receptor-like kinase that confers gene-for-gene resistance to races of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Wang *et al.*, 2006).

The citrus ESTs CX046706, CX044130 and CX643787 are homologous to WRKY factors induced by *Xanthomonas* pathogens, JA and ethylene, and that when overexpressed enhanced resistance against *Xanthomonas* and other pathogens (Liu *et al.*, 2007a; Oh *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). Members of the WRKY family have been implicated in the regulation of the transcriptional reprogramming associated with plant immune responses and they can act as positive and negative regulators of disease resistance (Eulgem and Somssich, 2007). This is consistent with the fact that both Xac and Xaa induced the expression of WRKY genes and that Xaa altered the expression of a greater number of such genes (Tables 4 and 5, and Supporting Information Tables S1–S7).

The increased expression of WRKY genes specifically induced by Xaa might also be associated with other Xaa-modulated genes. For instance, the EST AJ489090 (Table 5) is similar to the Arabidopsis receptor-like kinase RLK4, a downstream target of a WRKY induced by bacterial pathogens (Du and Chen, 2000). Similarly, CX640171 and CX292287 are related to members of the S gene family of receptor kinases SFR2 and ARK3, which are rapidly induced by bacterial pathogens and their expression requires W-box motifs in their promoters (Pastuglia *et al.*, 2002; Rocher *et al.*, 2005). Interestingly, W-box motifs have also been found in the promoters of defence-related GST and cytochrome P450 genes (Narusaka *et al.*, 2004; Shimono *et al.*, 2007)

homologous to many citrus genes preferentially induced by Xaa (Tables 3 and 5).

Most significantly, Xaa induced the expression of other protein kinases involved in HR-like cell death that are functionally connected to WRKY proteins. In particular, the citrus EST CX073386 is related to the tobacco mitogen-activated protein kinases (MAPK) SIPK, WIPK and Ntf4, known to play pivotal roles in plant innate immunity in the regulation of cell death triggered by different pathogens (Ren *et al.*, 2006). These protein kinases are rapidly activated via a MAPK cascade after pathogen recognition (Ren *et al.*, 2006). Surprisingly, the citrus EST CB610685 (Table 5) is similar to MAPK kinases (MAPKK or MEK) that interact and activate SIPK/WIPK/Ntf4 (Liu *et al.*, 2007b; Takahashi *et al.*, 2007). Activation of SIPK and WIPK by MEK2 in tobacco led to the induction of several defence-related genes including PR proteins and HIN1, which are also found up-regulated in Xaa-infected leaves. Remarkably, WRKYs have been recently shown to be substrates of MAPK and MEK (Andreasson *et al.*, 2005; Miao *et al.*, 2007), supporting the idea that the MEK2–SIPK/WIPK cascade activates transcription of WRKY factors which eventually activates downstream defence genes (Kim and Zhang, 2004).

Accordingly to the overall induction of HR-related genes, Xaa also induced the expression of several enzymes involved in oxidative burst responses (Table 5 and Supporting Information Tables S5–S7). In particular, we highlight the expression of two proline oxidase/dehydrogenases (CX544362, CK934047), which have been shown to induce ROS-dependent cell death in yeast and animal cells through depletion of protective proline levels (Chen *et al.*, 2006; Maxwell and Rivera, 2003). In addition, several cytochrome P450s and an FAD-linked oxidase (CX302002) implicated in hydrogen peroxide production (Carter and Thornburg, 2004) were specifically and strongly up-regulated by Xaa (Tables 5, S2, S4, S5 and S7).

Cell division and morphogenesis

A substantial number of citrus ESTs related to cell cycle, growth and differentiation showed altered expression preferentially in response to Xac, which strongly correlates with the development of hypertrophy and hyperplasia of the canker lesions (Fig. 1). However, genes that were commonly induced by both pathogens included ribosomal proteins and fibrillarins, indicating increased ribosomal RNA processing and ribosome assembly during bacterial infection. In addition, Xac and Xaa up-regulated genes homologous to prohibitins and immuno-reactant natriuretic peptide, known to control cell volume and expansion (Chen *et al.*, 2005) (Tables S8 and S9).

By contrast, genes homologous to TRIPTYCHON (TRY), suspensor-specific protein and rapid alkalization factor (RALF), were specifically up-regulated by Xac at 6 hpi (Table S5). TRY controls trichome and root hair cell patterning in Arabidopsis (Schellmann *et al.*, 2002), whereas RALF and suspensor-specific protein have

Table 5 Main disease resistance and defence-related genes specifically regulated by Xaa, relative to water treatments. The expression levels of genes identified by DD/SSH were determined by qRT-PCR. Negative numbers represent down-regulation. The complete list of defence-related genes specifically modulated by Xaa is found in Supporting Information Tables S6 and S7. Fold change values of Xac versus Xaa treatments are shown for comparison.

Target description	Citrus	Target	Change after treatment					
			Microarray				DD/SSH	
			6 hpi		48 hpi		48 hpi	
Disease resistance, defence and stress response	EST	Gene ID	Xaa	Xac/Xaa	Xaa	Xac/Xaa	Xaa	Xac
WRKY-type DNA binding protein [<i>A. thaliana</i>]	CX046706	AAP21232	3.3	-2.2	4.0	—	—	—
WRKY transcription factor 30 [<i>V. aestivalis</i>]	CX044130	AAR92477	3.6	—	—	—	—	—
WRKY transcription factor [<i>C. annuum</i>]	CX643787	AAW66459	—	—	9.4	-3.5	—	—
SPF1 protein [<i>I. batatas</i>]	CX294239	BAA06278	3.3	—	4.8	—	—	—
MYB family transcription factor (MYB63) [<i>A. thaliana</i>]	CN188989	NP 178039	3.6	-2.2	4.0	-2.0	—	—
No apical meristem (NAM) family protein [<i>A. thaliana</i>]	CN191283	NP 187057	3.4	-2.4	6.5	-2.2	—	—
Ubiquitin [<i>L. esculentum</i>]	CX296271	CAA51679	3.1	—	3.3	—	—	—
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 [<i>O. sativa</i>]	CX298761	XP 466921	—	—	5.2	-3.2	—	—
F-box family protein [<i>A. thaliana</i>]	DN623568	AAN31083	—	—	5.0	—	—	—
F-box family protein [<i>A. thaliana</i>]	CF509222	AAN18072	—	—	3.6	-2.2	—	—
Zinc finger (C3HC4-type RING finger) (BRH1) [<i>A. thaliana</i>]	CN190502	NP 191705	—	—	3.5	—	—	—
Zinc finger (C3HC4-type RING finger) [<i>A. thaliana</i>]	CX287180	NP 567222	—	—	3.4	-2.0	—	—
RING/C3HC4/PHD zinc finger-like protein [<i>C. melo</i>]	CN186687	AA045753	—	—	4.9	-2.0	—	—
Hin1 protein—common tobacco [<i>N. tabacum</i>]	CB293794	T03265	—	—	3.7	—	—	—
Disease resistance protein (CC-NBS-LRR) [<i>A. thaliana</i>]	CX544709	NP 195056	—	—	3.5	—	—	—
Putative protein kinase Xa21 [<i>O. sativa</i>]	CN190501	NP 918567	4.0	—	—	—	—	—
MAP kinase [<i>A. thaliana</i>]	CX073386	BAA04866	3.1	—	—	—	—	—
Putative receptor-like protein kinase 4 RLK4 [<i>A. thaliana</i>]	AJ489090	BAC42412	4.2	-2.6	—	—	—	—
Serine/threonine protein kinase isolog [<i>A. thaliana</i>]	CV717931	AAM20520	3.8	—	6.3	-2.6	—	—
Serine/threonine kinase [<i>O. sativa</i>]	CX640171	BAD53292	—	—	3.0	—	—	—
Receptor kinase 1 [<i>A. thaliana</i>]	CX292287	BAB02668	—	—	3.3	-2.4	—	—
Protein kinase [<i>A. thaliana</i>]	CX302153	NP 177852	4.8	-2.4	5.6	-2.7	—	—
Mitogen-activated protein kinase kinase MKK9 [<i>A. thaliana</i>]	CB610685	NP 177492	—	—	3.3	—	—	—
Receptor-like protein kinase [<i>N. tabacum</i>]	CX297031	BAC07504	—	—	4.0	—	—	—
Protein kinase-like protein [<i>A. thaliana</i>]	CX297218	CAB62310	—	—	10.6	-4.2	—	—
Respiratory burst oxidase 2 [<i>M. truncatula</i>]	CX309380	AAW78864	—	—	7.4	—	—	—
FAD-linked oxidase protein [<i>A. thaliana</i>]	CX302002	AAQ56827	26.4	-14.2	20.8	-14.0	—	—
Glycolate oxidase [<i>M. crystallinum</i>]	CK935794	AAB40396	3.3	-2.0	6.7	-2.3	—	—
CER1-like protein [<i>A. thaliana</i>]	CV704769	AAC24373	4.0	—	5.2	—	—	—
Peroxidase [<i>N. tabacum</i>]	CV884382	AAK52084	—	—	6.1	-2.3	—	—
Glutathione S-transferase [<i>E. esula</i>]	CX669862	AAF72197	—	—	4.2	—	—	—
Hemoglobin [<i>C. glauca</i>]	CX636043	CAA37898	—	—	9.9	-4.2	—	—
Thioredoxin family protein [<i>A. thaliana</i>]	CN186629	NP 200952	4.7	-2.2	—	—	—	—
Proline oxidase/dehydrogenase 1 [<i>N. tabacum</i>]	CX544362	AAT57674	6.0	-2.5	—	—	—	—
Proline dehydrogenase [<i>G. max</i>]	CK934047	AAR86686	9.2	-3.8	10.5	-3.8	—	—
Aldehyde dehydrogenase 1 precursor [<i>L. corniculatus</i>]	CX297720	AAO72532	4.1	-2.3	3.6	—	—	—
NADH glutamate dehydrogenase [<i>V. vinifera</i>]	CX306249	CAC18730	4.3	-2.8	11.7	-4.3	—	—
Leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein [<i>A. thaliana</i>]	CX674852	AAM91495	8.5	-5.2	4.5	—	—	—
Syringolide-induced protein 1-3-1A [<i>G. max</i>]	CN189156	BAB86892	3.7	—	3.8	—	—	—
Ferulate 5-hydroxylase [<i>C. acuminata</i>]	CF417783	AAT39511	4.7	—	3.1	—	—	—
N-hydroxylating cytochrome P450 [<i>M. esculenta</i>]	CN191734	AAF27289	7.4	-2.4	5.3	—	—	—
Cytochrome P450 [<i>H. tuberosus</i>]	CF504933	CAA04117	—	—	3.7	—	—	—
Cytochrome P450 [<i>P. communis</i>]	CX644731	AAL66194	—	—	3.5	—	—	—
Cytochrome P450 [<i>A. majus</i>]	CX308646	AAS90126	—	—	5.4	-2.2	—	—
Cytochrome P450 protein [<i>A. thaliana</i>]	CF509035	AAM14385	—	—	4.6	-2.0	—	—
Cytochrome P450 [<i>A. officinalis</i>]	CX668706	BAB40324	—	-3.9	11.5	-10.2	—	—
Germin-like protein [<i>A. thaliana</i>]	CN186507	P92997	—	—	26.9	-19.7	—	—
Nodulin26-like intrinsic protein [<i>P. sativum</i>]	DN958192	CAB45652	4.9	-2.0	—	—	—	—
MTD1 [<i>M. truncatula</i>]	CX669382	AAF86687	6.5	-3.8	—	—	—	—
Putative lipase [<i>A. thaliana</i>]	DN621566	NP 568327	3.6	—	4.0	—	—	—
12-oxophytodienoate reductase OPR2 [<i>A. thaliana</i>]	CX043279	BAC42387	6.0	-5.3	10.9	-6.0	—	—
Putative phosphatase [<i>L. esculentum</i>]	CX544543	CAD30864	4.7	-2.1	7.8	-2.9	—	—
Putative phosphatase [<i>L. esculentum</i>]	CX070476	CAD30863	5.5	-2.2	8.0	-3.5	19.8	3.0
Cysteine endopeptidase, papain-type (XCP2) [<i>A. thaliana</i>]	CK935239	NP 564126	-3.3	—	-3.3	—	—	—
Chalcone synthase 2 [<i>C. sinensis</i>]	CF833966	Q9XJ57	-3.2	—	-3.6	—	—	—
Aquaporin [<i>R. communis</i>]	BQ623782	CAE53882	-4.4	—	—	—	—	—

Table 6 Principal citrus genes related to cell division and morphogenesis up-regulated by Xac at 48 hpi. The complete list of genes related to cell division and morphogenesis modulated by Xac and Xaa is found in Supporting Information Tables S1–S9.

Target description	Citrus	Target	Fold change	
Cell division and morphogenesis	EST	Gene ID	Xac × H ₂ O	Xac × Xaa
Minichromosome maintenance 7 [<i>P. sativum</i>]	CX297398	AAQ72567	4.1	4.4
Minichromosomal maintenance factor [<i>T. aestivum</i>]	CV717182	AAS68103	3.4	3.6
Xylogen protein 1 [<i>Z. elegans</i>]	CK932766	NP 568984	5.3	—
Nucleosome assembly protein (NAP) [<i>A. thaliana</i>]	CX668339	NP 564063	4.5	—
Nucleolin homolog [<i>P. sativum</i>]	CV884300	AAA74208	3.5	—
Glycine-rich RNA-binding protein AtGRP2-like [<i>A. thaliana</i>]	CX640162	AAM62842	3.1	—
Putative RNA-binding protein [<i>A. thaliana</i>]	DN622183	AAM61313	3.4	—
RNA binding protein-like [<i>A. thaliana</i>]	CX075891	AAM61280	7.1	—
Putative GAR1 protein [<i>A. thaliana</i>]	CF833093	AAM14173	3.4	—
Histone H2A [<i>C. arietinum</i>]	CK935733	CAA07234	—	2.4
Histone H2A [<i>E. esula</i>]	CX667228	AAF65769	—	2.7
Putative histone H3 [<i>O. sativa</i>]	CF836726	XP 475315	—	2.3
Histone H3 [<i>O. sativa</i>]	CX643907	NP 910496	—	2.6
Lateral organ boundaries (LOB) domain protein [<i>A. thaliana</i>]	BQ623314	NP 172268	26.9	14.7
Gibberellin-regulated protein GASA5 [<i>A. thaliana</i>]	CX637545	S71371	24.2	24.9
GASAS-like protein [<i>P. mariana</i>]	CB250380	T51963	16.5	15.5
Putative cyclin-dependent kinase CDC2C [<i>O. sativa</i>]	CF503956	BAC79804	3.7	3.8
Cyclin d2 [<i>G. max</i>]	CV720002	AAS13370	—	2.6
Replication protein A1 [<i>O. sativa</i>]	CN190507	AAB71836	3.2	2.4
Calcium-binding protein [<i>L. corniculatus</i>]	CK932634	CAB63264	4.3	4.5
Putative WD-repeat protein [<i>A. thaliana</i>]	CB417354	AAL87290	3.6	—
Subtilase family protein [<i>A. thaliana</i>]	CK936343	NP 565330	7.8	3.5
Putative subtilisin serine protease [<i>A. thaliana</i>]	CX045698	AAN13182	7.2	4.6
Prohibitin 1-like protein [<i>B. napus</i>]	CV713016	AAK07610	3.1	—
Actin [<i>V. radiata</i>]	CN184021	AAF31643	3.0	2.1
Beta-tubulin [<i>G. hirsutum</i>]	CX672740	AAL92118	3.2	—
Beta-tubulin 2 [<i>L. albus</i>]	CX076714	AAB03267	—	3.7
Alpha-tubulin [<i>P. dulcis</i>]	CX078454	CAA47635	—	2.3
BY-2 kinesin-like protein 10 [<i>N. tabacum</i>]	CF828325	BAB40710	—	2.4
Putative dynein light subunit lc6 [<i>A. thaliana</i>]	CX644949	AAM20087	—	3.6
FH protein NFH2 [<i>N. tabacum</i>]	CV712442	AAF24497	—	3.6
Myosin [<i>D. discoideum</i>]	DT214435	EAL62703	—	3.3
Putative myosin heavy chain-like protein [<i>S. demissum</i>]	CV708208	AAT39303	—	2.5
Microtubule-associated protein MAP65-1c [<i>N. tabacum</i>]	CX673127	CAC17796	—	2.3
Microtubule-associated protein MAP65/ASE1 [<i>A. thaliana</i>]	CF832572	NP 200334	—	3.1

been implicated in cell growth and embryo development, respectively (Germain *et al.*, 2005; Weterings *et al.*, 2001).

The majority of differentially expressed genes implicated in cytokinesis were nevertheless detected 48 h after Xac infection (Fig. 2A and Tables 6, S2 and S3). Such a change in the transcriptional profile from 6 to 48 hpi indicates an alteration in the physiological status of the host cells, which would be reprogrammed for division and growth. For instance, the various histones and ribosomal proteins up-regulated by Xac may reflect the requirements of dividing cells but also an increase in general transcriptional activity. It is known that the state of chromatin has a major effect on the levels of gene expression, and histone modifications such as acetylation play an important role in regulation of

transcription in eukaryotes (Sterner and Berger, 2000). It is therefore interesting to note that Xac specifically up-regulated a GCN5 histone acetyltransferase (CF417594) known to regulate histone acetylation required for gene expression (Benhamed *et al.*, 2006), plant growth and development (Vlachonasios *et al.*, 2003) in *Arabidopsis* (Tables 6, S5 and S6).

Consistent with an increased transcriptional activity of ribosome biosynthesis genes, Xac induced the expression of several RNA recognition motif (RRM) proteins such as nucleolins (CV884300, CF833651) and GAR1 (CF833093) required for rDNA chromatin organization and ribosome synthesis (Girard *et al.*, 1992; Pontvianne *et al.*, 2007) (Tables 6, S5 and S6). Significantly, expression of nucleolin correlated with cell proliferation in alfafa

(Bogre *et al.*, 1996) and mutations in the Arabidopsis nucleolin PARL1 affected leaf development (Petricka and Nelson, 2007).

Xac also up-regulated genes implicated in cell cycle control, including nucleosome assembly protein (NAP1), minichromosome maintenance (MCM) factors, fringe, response regulators and cyclin-dependent kinases (Tables 6, S2 and S3). NAP1 facilitates nucleosome assembly by acting as a histone chaperone, and in tobacco it binds to histone 2A, cyclin and tubulin (Dong *et al.*, 2005), proteins that were abundantly detected in Xac-infected leaves (Tables 6, S2 and S3). Similar to NAP1, which controls cell proliferation and expansion during Arabidopsis leaf development (Galichet and Gruissem, 2006), MCM proteins play an important role in cell cycle control and are essential for the initiation of DNA replication (Braun and Breeden, 2007; Stevens *et al.*, 2002). Notably, fringe genes regulate dorsal–ventral boundary determination in animal cells through modulation of the Notch pathway, which is connected to the MCM complex during cell cycle progression (Jinek *et al.*, 2006; Noseda and Karsan, 2006).

In addition to tubulins, Xac induced various cytoskeleton proteins including actin, formin, myosin, kinesin, dynein and microtubule-associated proteins, known to be required for the progression of cytokinesis (Favery *et al.*, 2004; Shima *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2004). For instance, the citrus EST CV712442 is homologous to AtFH6, an Arabidopsis formin that is up-regulated in hypertrophied giant cells induced by nematodes (Favery *et al.*, 2004) (Tables 6, S2 and S3). Thus, the up-regulation of cytoskeleton proteins in Xac-infected leaves is consistent with the idea that actin cables and microtubules are not only required for cytokinesis but also for the vesicle trafficking associated with cell-wall biogenesis discussed above.

Xac also induced the expression of genes homologous to LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB), GASA and subtilases related to ABNORMAL LEAF SHAPE (ALE1) (Tables 6, S2 and S3). These proteins have been implicated in lateral organ fate, GA responses and epidermal surface formation, respectively (Ha *et al.*, 2007; Roxrud *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2001). In particular, both LOB (BQ623314) and GASA (CX637545 and CB250380) homologues were strongly induced by Xac at 48 hpi (Table 6), and this might be associated with the up-regulation of GA biosynthesis genes (Table 2).

Ethylene synthesis and signalling

Ethylene regulates a variety of developmental processes and stress responses in plants, including seed germination, cell elongation, senescence, fruit ripening and defence. Nonetheless, it has long been known that ethylene can either promote disease resistance or susceptibility depending on the host–pathogen interaction (Broekaert *et al.*, 2006). Here, we observed considerable changes in the transcriptional profiles of genes related to

ethylene synthesis, signalling and perception after Xac and Xaa infection, suggesting that these bacteria stimulate ethylene production in citrus plants (Fig. 2). However, although both bacteria were capable of modulating the expression of key genes of ethylene biosynthesis including 1-aminocyclopropene-1-carboxylic acid (ACC) synthase and ACC oxidases, ethylene receptors and various transcriptional factors carrying an AP2/EREBP-like domain, most of these genes were induced at higher levels by Xaa at 6 and 48 hpi (Fig. 2A, Table 7 and Supporting Information Tables S2–S9).

ACC synthase and ACC oxidase are known to play pivotal roles in ethylene biosynthesis and in many cases their expression levels are affected by pathogen attack (Broekaert *et al.*, 2006). Interestingly, Xaa specifically up-regulated an ACC synthase (AJ012696) at 48 hpi (Table 7), indicating that ethylene synthesis is maintained during Xaa relative to Xac infection. This idea is supported by the fact that genes related to ACC oxidases (CX292966, CX302270), ethylene receptor (CX674473), ethylene-induced esterases (CB290370, CF835645) and ethylene response factors (ERF) (CN185598, CX043799) were detected at higher levels in Xaa-infiltrated leaves and additional ERF and AP2/EREBP genes were specifically modulated by Xaa at 48 hpi (Table 7). By contrast, Xac up-regulated a smaller number of ethylene synthesis and signalling genes, including AP2/EREBP, and specifically down-regulated a beta-cyanoalanine that catalyses the detoxification of cyanide formed during ethylene biosynthesis (Yip and Yang, 1988), suggesting that ethylene production in Xac-infiltrated leaves was lowered by 48 hpi (Fig. 2, Table 7).

These observations suggest that, at least in the Xaa–Pêra interaction, ethylene synthesis and signalling might be associated with disease resistance rather than susceptibility. The increased number of ERF- and AP2/EREBP-related genes modulated by Xaa supports this notion. These factors control the expression of many PR proteins and effectors of the defence response (Broekaert *et al.*, 2006) and their increased expression in Xaa-infiltrated leaves correlates with the higher PR gene expression induced by Xaa (Table 3). Accordingly, as ethylene and JA can act synergistically to induce certain PR proteins in defence reactions it is interesting to note that Xaa also up-regulated a number of genes related to JA biosynthesis including lipoxygenases (Table S1) and 12-oxophytodienoate reductase (Table 5). Significantly, consistent with the cross-talk that occurs between defence response pathways controlled by JA, ethylene and salicylic acid (SA), the EST CB290370, which is preferentially up-regulated by Xaa, encodes an ethylene-induced esterase that is similar to SABP2, an SA-binding protein from tobacco required for plant immune response (Kumar and Klessig, 2003).

Taken together, the transcriptional profiles of ethylene synthesis and signalling genes of Xac- and Xaa-infiltrated leaves strongly suggest that ethylene plays a key role in the defence response against Xaa.

Table 7 Principal ethylene synthesis and signalling genes modulated by Xac and Xaa at 6 and 48 hpi, relative to water-infiltrated leaves. The complete list of ethylene synthesis and signalling genes with altered expression upon Xac/Xaa infection is found in Supporting Information Tables S2–S9.

Target description	Citrus	Target	Change after treatments			
			6 hpi		48 hpi	
Ethylene synthesis and signalling	EST	Gene ID	Xaa	Xac	Xaa	Xac
Xac- and Xaa-regulated genes						
ACC synthase [<i>C. sinensis</i>]	CX643923	CAB60722	3.05	4.0	—	—
ACC oxidase [<i>C. sinensis</i>]	CB322167	AAG49361	4.21	3.9	4.8	3.8
Ethylene-forming-enzyme [<i>A. thaliana</i>]	CX292966	BAB10730	16.48	12.5	18.8	5.9
Ethylene-forming-enzyme [<i>A. thaliana</i>]	CX302270	AAM65315	26.52	21.3	26.9	9.3
Ethylene-induced esterase [<i>C. sinensis</i>]	CB290370	AAK58599	8.54	4.8	27.7	5.3
Ethylene-induced esterase [<i>C. sinensis</i>]	CF835645	AAK58599	10.40	4.8	105.9	18.4
AP2 domain transcription factor [<i>A. thaliana</i>]	CX299615	BAB08875	17.22	4.5	12.9	50.0
AP2 domain transcription factor [<i>A. thaliana</i>]	CF509751	NP 196837	—	—	10.1	6.4
ATERF5 [<i>A. thaliana</i>]	CK936491	BAA97157	5.81	5.7	—	—
AtERF1 [<i>A. thaliana</i>]	CK939541	O80337	5.64	5.0	—	—
ERF [<i>L. esculentum</i>]	CN185598	AAN77067	—	—	15.7	4.5
Ethylene receptor [<i>Fragaria × ananassa</i>]	CX674473	CAC48386	—	—	32.3	13.0
Putative ethylene receptor [<i>C. sinensis</i>]	CX667638	AAC99435	—	—	5.7	4.0
DNA binding protein S25-XP1 [<i>N. tabacum</i>]	CX043799	T03927	—	—	16.3	6.8
AP2/EREBP transcription factor [<i>A. thaliana</i>]	CX546122	AAT44918	—	—	−4.1	−4.2
AP2 domain transcription factor [<i>A. thaliana</i>]	CK938211	NP 201520	—	—	−4.9	−3.5
Xac-regulated genes						
EREBP [<i>N. tabacum</i>]	DN617716	BAA07323	—	3.0	—	—
AP2 domain-containing protein [<i>A. thaliana</i>]	CX298932	NP 172723	—	3.3	—	—
DREBP 5 [<i>G. max</i>]	CX665765	ABQ53928	—	−3.2	—	5.9
Beta-cyanoalanine synthase [<i>B. pendula</i>]	DN958104	AAN86822	—	—	—	−5.6
Xaa-regulated genes						
ACC synthase [<i>C. sinensis</i>]	AJ012696	CAB60831	—	—	5.0	—
AP2/EREBP [<i>G. hirsutum</i>]	CB292635	AAV51937	—	—	5.6	—
ERF like protein [<i>C. melo</i>]	CK936741	BAD01556	—	—	4.0	—
Transcriptional activator PTI5 [<i>L. esculentum</i>]	CN187333	O04681	—	—	3.6	—
DNA binding protein S25-XP1 [<i>N. tabacum</i>]	DN795374	T03927	—	—	9.4	—
AP2 domain-containing protein [<i>A. thaliana</i>]	CB304607	NP 176620	—	—	−4.2	—
AP2 domain-containing protein [<i>A. thaliana</i>]	CX288967	CAB96654	—	—	−3.9	—

Retroelement and transposition

A number of differentially expressed genes identified by microarray (CX072598, CN182725, CN182543, CN183624) and DD/SSH (AF369930, CX052914) are homologous to copia-like retrotransposons and polyproteins. These genes were up-regulated by both Xac and Xaa at 6 and 48 hpi; however, their expression levels were relatively higher in Xaa-infected leaves (Tables S1–S9).

In plant genomes, retrotransposons constitute the major mobile genetic elements and are important for the evolution of the genome structure and function (Grandbastien, 1992). Interestingly, most of the citrus genes identified here are homologous to retrotransposons that have been mapped in close proximity or within clusters of resistance genes (Parniske and Jones, 1999; Wei *et al.*, 2002), and in such genome organizations they are thought to provide resistance gene duplications, insertions or

deletions generating new recognition specificities (Paal *et al.*, 2004). This is reminiscent of the systemic DNA rearrangement induced by a viral pathogen in tobacco, which suggested the existence of a systemic recombination signal (Kovalchuk *et al.*, 2003). Accordingly, the expression of the tomato TCL1.1 retrotransposon is induced by several plant hormones, but most notably by ethylene (Tapia, *et al.*, 2005). Thus, it is tempting to speculate that the up-regulation of citrus mobile elements by Xac and Xaa might be the result of the transcriptional changes in the ethylene synthesis and signalling genes described above. Also in agreement with the up-regulation of retrotransposons in citrus leaves, Xac and Xaa induced the expression of various citrus ESTs (CK933117, CN186009, CF509054, CF832466) homologous to tobacco MYB2, a transcriptional factor that recognizes conserved DNA motifs in the Tto1 retrotransposon promoter and activates its transcription (Sugimoto, *et al.*, 2000).

Carbon and nitrogen metabolism

Both Xac and Xaa altered the expression of a significant number of genes related to carbon and nitrogen metabolism (Fig. 2). Among the commonly modulated genes, we highlight the up-regulation of invertases, asparagine, glutamine and tryptophan synthases, phosphoenolpyruvate-carboxylase kinases, succinyl-CoA ligases, prolyl-carboxypeptidase, 3-deoxy-D-arabino-heptulose 7-phosphate synthases and a number of sugar, amino acid and nitrate transporters, most of which were strongly induced at 6 and 48 hpi. By contrast, genes commonly down-regulated by Xac and Xaa include the small subunit of Rubisco, Rubisco activase, fructose-1,6-bisphosphatase, fructose-bisphosphate aldolases and serine hydroxymethyltransferase (Tables S1, S8 and S9).

These transcriptional changes are thus in agreement with the fact that plants infected with biotrophic pathogens normally show lower photosynthesis rates, increased protein degradation and higher nutrient mobilization towards infection sites. For instance, reduction in photosynthesis has been attributed to an early expression of invertases and the accumulation of hexoses (Swarbrick *et al.*, 2006; Walters and McRoberts, 2006). Interestingly, among the various sugar transporters up-regulated at 6 and 48 hpi is a hexose transporter (CF509967) (Tables S8 and S9). In addition, the elevated expression of asparagine synthase, glutamine synthase and nitrate transporters suggest an increased mobilization of nitrogen in the infection site, whereas the strong induction of a prolyl-carboxypeptidase indicates augmented protein catabolism.

We found, however, that Xaa altered the expression of a significantly greater number of carbon and nitrogen metabolism genes relative to Xac at 6 and 48 hpi (Fig. 2). In particular, Xaa induced various amino-transferases, beta-amylases and additional sugar and amino acid transporters (Tables S1, S2, S4, S5 and S7). This suggests that nutrient mobilization might be associated with the energy supply required for defence reactions or, as pointed out recently, it could act as a signal for defence (Halford and Paul, 2003; Swarbrick *et al.*, 2006). Accordingly, Xaa induced the expression of specific trehalose-6-phosphate synthase (CX299159) and trehalose-6-phosphate phosphatases (CX636014, CF831824), both involved in the synthesis of trehalose (Tables S2, S4, S5 and S7). These sugar metabolites have gained the status of signalling molecules that regulate plant metabolism, development and stress responses (Grennan, 2007; Wilson *et al.*, 2007). Moreover, two Xaa-induced ESTs (CX672184, CX639947) are homologous to sucrose nonfermenting-1 (SNF1), a protein kinase that plays a central role in trehalose metabolism, sugar signalling and homeostasis (Polge and Thomas, 2007). Most significantly though, an Arabidopsis SNF1-related protein kinase (SnRK1) was shown to interact with proteins implicated in pathogen resistance (Gissot *et al.*, 2006). Hence, it appears that the changes in trehalose biosynthesis enzymes and SNF1-related kinase observed in

Xaa-infected leaves might indeed be associated with a defence response.

Xac induced the expression of a trehalose-6-phosphate phosphatase (CD575394) but not trehalose-6-phosphate synthase or SNF1 (Table S3). It is interesting to note that Arabidopsis plants overexpressing trehalose-6-phosphate phosphatase exhibited larger leaves than wild-type plants and the accumulation of trehalose-6-phosphate caused inhibition of seedling growth (Schluepmann *et al.*, 2003; 2004), indicating that up-regulation of trehalose-6-phosphate phosphatase alone promotes cell growth.

Putative transcription factors

Several genes homologous to transcription factors showed altered expression after Xac and Xaa infection, particularly at 48 hpi (Fig. 2 and Tables S2–S9). Some of the genes that were up-regulated by Xac and Xaa (CV884345, CX295885, CK739629 and CN187819) are similar to tobacco BZI-1, a bZIP factor that binds the GH3 gene promoter and modulates auxin-induced transcription (Heinekamp *et al.*, 2004). This correlates with the up-regulation of GH3 genes by both pathogens at 48 hpi (Table 2). In addition, we highlight the up-regulation of a gene (CX669831) homologous to ORCA3, a JA-induced transcription factor involved in the activation of terpenoid biosynthetic genes (Vom Endt *et al.*, 2007).

Interestingly, Xac specifically up-regulated a bZIP transcriptional activator (CV719678) similar to RSG (repression of shoot growth), which regulates tobacco cell elongation by controlling the levels of gibberellins (Fukazawa *et al.*, 2000) (Table S3). In contrast, Xaa specifically repressed the expression of a basic helix–loop–helix factor (CX045057) implicated in cell proliferation (Heim *et al.*, 2003), whereas it up-regulated a gene (CF509564) homologous to CCR4-associated factor CaCAF1, required for defence response. Notably, silencing of CaCAF1 in pepper plants increased susceptibility to Xcv infection (Sarowar *et al.*, 2007). In addition, Xaa up-regulated two ESTs (CX543536, CF832559) related to GT-2 factors implicated in auxin signalling (O'Grady *et al.*, 2001), which might be associated with the increased up-regulation of auxin-responsive genes induced by Xaa at 6 hpi (Fig. 2 and Table S7).

Unknown genes

On average, approximately 35% of all citrus genes identified by microarray analyses as differentially expressed in response to Xac or Xaa infection show no similarities to plant genes or are homologous to genes of unknown function (Fig. 2). In addition, nearly 40% of the genes identified by DD/SSH showed no similarities to known genes or to citrus ESTs (Table S1). This reflects our current limited knowledge of gene functions related to disease resistance and symptom development.

GENERAL DISCUSSION

In this study, we focused on the early transcriptional modifications that occur in sweet orange leaves after Xac and Xaa infection with the aim of understanding the differential pathogenicity exhibited by these bacteria on Pêra plants and identifying the genes involved in canker development. We provide strong evidence for a coordinated expression of cell-wall remodelling, vesicle trafficking and cell division genes that are likely to play a role in symptom development. This is supported by the observation that the formation of canker lesions is inhibited by brefeldin A, a clear indication of the functional connection between these categories of genes. On the other hand, our data point to a much stronger defence response triggered by Xaa. Interestingly, however, the expression profiles of the Xac/Xaa commonly regulated genes are remarkably similar to transcriptional changes triggered by PAMPs in other plant–pathogen interactions, which is in accordance with the idea that transcriptional differences in response to bacterial challenges are predominantly determined by PAMPs (Navarro *et al.*, 2004; Truman *et al.*, 2006). Moreover, the major differences observed in the transcriptional profiles between Xac- and Xaa-infected leaves are in agreement with the proposed zigzag model of plant immunity (Jones and Dangl, 2006), in which Xac would suppress PAMP-triggered immunity (PTI) via translocation of effector proteins including PthAs (Fujikawa *et al.*, 2006). This idea is supported by the fact that a significantly smaller number of defence-related genes are altered by Xac at 6 and 48 hpi relative to Xaa, and although Xac induced a great number of plant defence genes, the amplitude of this response is not sufficient to halt Xac's growth or to establish an effective HR, as envisaged in the zigzag model.

Although it is not yet clear how Pêra plants stop Xaa exponential growth, the results shown here indicate that Xaa induces a MAP kinase cascade that would culminate with the activation of a variety of defence-related genes involved in ROS production and programmed cell death. The inability of Xaa to suppress defences on sweet orange suggests that it cannot successfully translocate effector proteins to block PTI, or one of its effectors might be recognized by the host triggering defence. Significantly, we cloned two *pthA* homologues from Xaa that are more similar to *pthB* and *pthC* genes recently characterized in another representative C strain of Xaa (Al-Saadi *et al.*, 2007) than to the four *pthAs* from Xac (da Silva *et al.* 2002). This raises the possibility that one of them may act as an avirulence factor in sweet orange, and our current knowledge on the mechanism of action of this class of bacterial effectors suggests that they could transactivate a citrus resistance gene (Römer *et al.*, 2007). Although *pthC* from Xaa strain C340 does not appear to act as an *avr* gene (Al-Saadi *et al.*, 2007), a recent study has shown that the *pthA* homologue *hssB3.0* is responsible for host-specific suppression of virulence in *Citrus grandis* (Shiotani *et al.*, 2007). This is the first evidence

indicating that PthA proteins can behave as avirulence factors on citrus. Interestingly, *hssB3.0* reduced the ability of Xac to multiply in plant tissues, enhanced PAL expression and partially interrupted canker development elicited by another PthA homologue (Shiotani *et al.*, 2007), a phenomenon that in many aspects resembles the Pêra–Xaa interaction, where micropustules developed in spite of a resistance response. As citrus canker is dependent on very similar PthA-like proteins (Al-Saadi *et al.*, 2007) that dimerize in the host cell prior to nuclear import (Gürlebeck *et al.*, 2005), it is possible that depending on the repertoire of PthA proteins delivered, different heterodimers may form and their interaction with host targets may determine the outcome of the host response, whether disease resistance or canker development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material and bacterial infiltration

Six-month-old plants of sweet orange (*C. sinensis*) 'Pêra' and 'Cristal' cultivars as well as Mexican lime 'Galego' (*Citrus aurantifolia*) and 'Siciliano' lemon (*C. limon*) were obtained from certified nurseries and kept in a growth room at 25–28 °C under a 14-h/day fluorescent light. Plant leaves were infiltrated with suspensions of Xac (strain 306, da Silva *et al.*, 2002) or Xaa pathotype C (strain ICMP 8435). Bacterial cells grown in LB medium without NaCl (LBON) for 48 h at 28 °C with shaking at 200 r.p.m. were recovered by centrifugation and resuspended in sterile water ($OD_{600nm} = 0.6$). Leaf sectors were infiltrated with approximately 0.3 mL of the bacterial suspensions or water as control.

For brefeldin A experiments, Pêra leaves were pre-infiltrated with solutions of 0.2 mM brefeldin A (Sigma) in 0.5% DMSO or 0.5% DMSO only as control. After 24 h, the same leaf sectors were infiltrated with a water suspension of Xac ($OD_{600nm} = 0.5$) and the appearance of canker pustules was monitored daily. Brefeldin A did not affect Xac growth on culture media.

Bacterial growth curves

Bacterial cells grown in LBON for 24 h were pelleted and resuspended in sterile water to a cell density of 10^7 colony forming units (cfu) per mL. Cells were infiltrated on *C. sinensis* leaves and after different time intervals leaf discs were collected for bacterial recovery and counting of the number of viable cells.

Plant mRNA purification

Total RNA was extracted from sweet orange leaves at different time intervals after water and bacterial infiltration treatments using Trizol (Invitrogen), followed by mRNA purification with FastTrack 2.0 (Invitrogen). The quality and quantity of the mRNA

samples were verified by agarose gel and UV spectroscopy (Sambrook and Russel, 2001).

Differential display and suppressed subtractive hybridization

Differential display was performed according to standard procedures (Sambrook and Russel, 2001), except that first-strand cDNA was synthesized using ordinary oligo-dT, instead of anchoring primers, and the cDNAs were amplified by PCR using a set of decamer oligonucleotides (Operon). A total of 40 different combinations of decamer pairs were used in PCR reactions in the presence of $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP. PCR products were separated in denaturing sequencing gels and the differentially expressed bands, detected by autoradiography, were re-amplified, cloned in pGemT (Promega) and sequenced.

Suppressed subtractive hybridization was carried out according to Diatchenko *et al.*, (1999) with the exception that an *Nla*III site was inserted at the 3'-end of the adaptors in order to favour adaptor ligation to *Nla*III-cut cDNAs. Double-strand cDNAs were prepared from mRNAs isolated from sweet orange leaves infiltrated with Xac or Xaa for 48 h and from leaves infiltrated with Xac or water for 10 days, when canker lesions were visible. Subtractions were made between cDNAs from Xac- (tester) versus Xaa-infiltrated leaves (driver) and from Xac- (tester) versus water-infiltrated leaves (driver). After subtraction, approximately 1000 clones were isolated and screened for differentially expressed cDNAs by dot blot, as described (Diatchenko *et al.*, 1999).

Quantitative PCR and Northern blot analysis

Primers for qRT-PCR were designed using the Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems). cDNAs from water- or pathogen-infiltrated leaves were reverse transcribed using oligo-dT (Sambrook and Russel, 2001) and used at different concentrations to test the efficiency of the amplifications between targets and internal controls. Two internal controls were used (CK937155-hypothetical protein and AAR89627-elongation factor). The expression levels of both internal controls in Xac-, Xaa- or water-infiltrated leaves were verified by Northern blotting and shown to have similar banding patterns (not shown). Three qRT-PCR reactions were performed on each mRNA sample using the SYBR-green mix and the universal conditions of amplification provided by the 7500 System (Applied Biosystems). Dissociation curves were analysed in every amplification mixture and when more than one peak was observed, the qRT-PCR conditions were changed so as to obtain a single dissociation product. The results were analysed by the 7500 System software (Applied Biosystems) using the relative quantification mode.

Northern blotting was performed using formaldehyde gels (Sambrook and Russel, 2001). Approximately 10 μg of total RNA

extracted from water- or pathogen-infiltrated orange leaves was separated in denaturing agarose gels and transferred to nylon membranes. After hybridization to specific ^{32}P -labelled DNA probes, membranes were washed and images were captured from the exposed phosphorimager screens.

Microarray analysis

Two independent mRNA samples (0.6 μg) extracted from citrus leaves infiltrated with water, Xac or Xaa at 6 and 48 hpi, were hybridized to Affymetrix GeneChip citrus genome arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) according to Affymetrix's instructions. Stained arrays were scanned on the Gene Chip Scanner 3000-7G using the Gene Chip Operating Software (GCOS) version 1.4. Filter on calls, variance stabilization, log transformation, background subtraction, average computing and significance analysis ($P \leq 0.05$) were obtained from two GCOS CEL files of each treatment using the MAS5 algorithm from the ArrayAssist software package (ArrayAssist x.5, Stratagene, USA). The microarray data have been deposited in GEO database as GSE10798 series.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Júlio Rodrigues Neto for providing the Xaa pathotype C strain and Patrick Cooke and Adriana C. Alves for technical help with the Affymetrix microarray system. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 98/14138-2; 00/10266-8; 03/08316-5). R.A.C. and C.E.B. received fellowships from FAPESP and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), respectively.

REFERENCES

- Al-Saadi, A., Reddy, J.D., Duan, Y.P., Brunings, A.M., Yuan, Q. and Gabriel, D.W. (2007) All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one *pthA* homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **20**, 934–943.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O. and Mundy, J. (2005) The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J.* **24**, 2579–2589.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. and Schulze-Lefert, P. (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, **295**, 2073–2076.
- Benhamed, M., Bertrand, C., Servet, C. and Zhou, D.X. (2006) Arabidopsis GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell*, **18**, 2893–2903.
- Bienert, G.P., Moller, A.L., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Moller, I.M., Schjoerring, J.K. and Jahn, T.P. (2006) Specific aquaporins facilitate the

- diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* **282**, 1183–1192.
- Bird, D.A., Franceschi, V.R. and Facchini, P.J. (2003) A tale of three cell types: alkaloid biosynthesis is localized to sieve elements in opium poppy. *Plant Cell*, **15**, 2626–2635.
- Bogre, L., Jonak, C., Mink, M., Meskiene, I., Traas, J., Ha, D.T., Swoboda, I., Plank, C., Wagner, E., Heberle-Bors, E. and Hirt, H. (1996) Developmental and cell cycle regulation of alfalfa nucMs1, a plant homolog of the yeast Nsr1 and mammalian nucleolin. *Plant Cell*, **8**, 417–428.
- Braun, K.A. and Breeden, L.L. (2007) Nascent transcription of MCM2–7 is important for nuclear localization of the minichromosome maintenance complex in G1. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1447–1456.
- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F. and Cammue, B.P. (2006) The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**, 393–416.
- van den Brûle, S. and Smart, C.C. (2002) The plant PDR family of ABC transporters. *Planta*, **216**, 95–106.
- Brunings, A.M. and Gabriel, D.W. (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* **4**, 141–157.
- Carter, C.J. and Thornburg, R.W. (2004) Tobacco nectarin V is a flavin-containing berberine bridge enzyme-like protein with glucose oxidase activity. *Plant Physiol.* **134**, 460–469.
- Chen, C., Wanduragala, S., Becker, D.F. and Dickman, M.B. (2006) Tomato QM-like protein protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress by regulating intracellular proline levels. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4001–4006.
- Chen, J.C., Jiang, C.Z. and Reid, M.S. (2005) Silencing a prohibitin alters plant development and senescence. *Plant J.* **44**, 16–24.
- Coaker, G., Falick, A. and Staskawicz, B. (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science*, **308**, 548–550.
- Coletta-Filho, H.D., Takita, M.A., Souza, A.A., Neto, J.R., Destéfano, S.A., Hartung, J.S. and Machado, M.A. (2006) Primers based on the *rpfg* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 279–285.
- Consonni, C., Humphry, M.E., Hartmann, H.A., Livaja, M., Durner, J., Westphal, L., Vogel, J., Lipka, V., Kemmerling, B., Schulze-Lefert, P., Somerville, S.C. and Panstruga, R. (2006) Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nat. Genet.* **38**, 716–720.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.B. and Roby, D. (1999) A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *Plant J.* **20**, 57–66.
- Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y.-F.C. and Siebert, P.D. (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Meth. Enzymol.* **303**, 349–380.
- Dong, A., Liu, Z., Zhu, Y., Yu, F., Li, Z., Cao, K. and Shen, W.H. (2005) Interacting proteins and differences in nuclear transport reveal specific functions for the NAP1 family proteins in plants. *Plant Physiol.* **138**, 1446–1456.
- Dong, W., Nowara, D. and Schweizer, P. (2006) Protein polyubiquitination plays a role in basal host resistance of barley. *Plant Cell*, **18**, 3321–3331.
- Du, L. and Chen, Z. (2000) Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**, 837–847.
- Duan, Y.P., Castañeda, G.Z., Erdos, G. and Gabriel, D.W. (1999) Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **12**, 556–560.
- Ender, F., Godl, K., Wenzl, S. and Sumper, M. (2002) Evidence for autocatalytic cross-linking of hydroxyproline-rich glycoproteins during extracellular matrix assembly in *Volvox*. *Plant Cell*, **14**, 1147–1160.
- Eudes, A., Pollet, B., Sibout, R., Do, C.T., Seguin, A., Lapierre, C. and Jouanin, L. (2006) Evidence for a role of AtCAD 1 in lignification of elongating stems of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **225**, 23–39.
- Eulgem, T. and Somssich, I.E. (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 366–371.
- Favery, B., Chelysheva, L.A., Lebris, M., Jammes, F., Marmagne, A., De Almeida-Engler, J., Lecomte, P., Vauzy, C., Arkowitz, R.A. and Abad, P. (2004) *Arabidopsis* formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *Plant Cell*, **16**, 2529–2540.
- Fujikawa, T., Ishihara, H., Leach, J.E. and Tsuyumu, S. (2006) Suppression of defense response in plants by *avrBs3/pthA* gene family of *Xanthomonas* spp. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **19**, 342–349.
- Fukazawa, J., Sakai, T., Ishida, S., Yamaguchi, I., Kamiya, Y. and Takahashi, Y. (2000) Repression of shoot growth, a bZIP transcriptional activator, regulates cell elongation by controlling the level of gibberellins. *Plant Cell*, **12**, 901–915.
- Galichet, A. and Grissem, W. (2006) Developmentally controlled farnesylation modulates AtNAP1.1 function in cell proliferation and cell expansion during *Arabidopsis* leaf development. *Plant Physiol.* **142**, 1412–1426.
- Germain, H., Chevalier, E., Caron, S. and Matton, D.P. (2005) Characterization of five RALF-like genes from *Solanum chacoense* provides support for a developmental role in plants. *Planta*, **220**, 447–454.
- Girard, J.P., Lehtonen, H., Caizergues-Ferrer, M., Amalric, F., Tollervey, D. and Lapeyre, B. (1992) GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J.* **11**, 673–682.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.P., Kreis, M. and Thomas, M. (2006) AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol.* **142**, 931–944.
- Goujon, T., Sibout, R., Pollet, B., Maba, B., Nussaume, L., Bechtold, N., Lu, F., Ralph, J., Mila, I., Barriere, Y., Lapierre, C. and Jouanin, L. (2003) A new *Arabidopsis thaliana* mutant deficient in the expression of O-methyltransferase impacts lignins and sinapoyl esters. *Plant Mol. Biol.* **51**, 973–989.
- Grandbastien, M.A. 1992. Retroelements in higher plants. *Trends Genet.* **8**, 103–108.
- Greenwood, J.S., Helm, M. and Gietl, C. (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 2238–2243.
- Grennan, A.K. (2007) The role of trehalose biosynthesis in plants. *Plant Physiol.* **144**, 3–5.
- Gürlebeck, D., Szurek, B. and Bonas, U. (2005) Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.* **42**, 175–187.
- Ha, C.M., Jun, J.H., Nam, H.G. and Fletcher, J.C. (2007) BLADE-ON-PETIOLE 1 and 2 control *Arabidopsis* lateral organ fate through regulation of LOB domain and adaxial-abaxial polarity genes. *Plant Cell*, **19**, 1809–1825.

- Halford, N.G. and Paul, M.J. (2003) Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnol. J.* **1**, 381–398.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. and Bailey, P.C. (2003) The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 735–747.
- Heinekamp, T., Strathmann, A., Kuhlmann, M., Froissard, M., Muller, A., Perrot-Rechenmann, C. and Droge-Laser, W. (2004) The tobacco bZIP transcription factor BZI-1 binds the GH3 promoter in vivo and modulates auxin-induced transcription. *Plant J.* **38**, 298–309.
- Hu, H., Dai, M., Yao, J., Xiao, B., Li, X., Zhang, Q. and Xiong, L. (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 12987–12992.
- Hückelhoven, R. (2007) Transport and secretion in plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 573–579.
- Jayaraj, J. and Punja, Z.K. (2007) Combined expression of chitinase and lipid transfer protein genes in transgenic carrot plants enhances resistance to foliar fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* **26**, 1539–1546.
- Jinek, M., Chen, Y.W., Clausen, H., Cohen, S.M. and Conti, E. (2006) Structural insights into the Notch-modifying glycosyltransferase Fringe. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 945–946.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329.
- Juárez-Díaz, J.A., McClure, B., Vázquez-Santana, S., Guevara-García, A., León-Mejía, P., Márquez-Guzmán, J. and Cruz-García, F. (2006) A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **281**, 3418–3424.
- Kalde, M., Nühse, T.S., Findlay, K., Peck, S.C. (2007) The syntaxin SYP132 contributes to plant resistance against bacteria and secretion of pathogenesis-related protein 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 11850–11855.
- Kawasaki, T., Nam, J., Boyes, D.C., Holt, B.F. 3rd, Hubert, D.A., Wiig, A. and Dangl, J.L. (2005) A duplicated pair of Arabidopsis RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response. *Plant J.* **44**, 258–270.
- Kawasaki, T., Koita, H., Nakatsubo, T., Hasegawa, K., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Umemura, K., Umezawa, T. and Shimamoto, K. (2006) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 230–235.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, **318**, 648–651.
- Kim, C.Y. and Zhang, S. (2004) Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant J.* **38**, 142–151.
- Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., Kalck, V., Boyko, V., Filkowski, J., Heinlein, M. and Hohn, B. (2003) Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements. *Nature*, **423**, 760–762.
- Krüger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M., Tang, S., Mulder, L. and Jones, J.D. (2002) A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science*, **296**, 744–747.
- Kumar, D. and Klessig, D.F. (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 16101–16106.
- Laloi, C., Mestres-Ortega, D., Marco, Y., Meyer, Y. and Reichheld, J.P. (2004) The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol.* **134**, 1006–1016.
- Laxalt, A.M. and Munnik, T. (2002) Phospholipid signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 332–338.
- Li, Y., Jones, L. and McQueen-Mason, S. (2003) Expansins and cell growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 603–610.
- Liu, X., Bai, X., Wang, X. and Chu, C. (2007a) OsWRKY71, a rice transcription factor, is involved in rice defense response. *J. Plant Physiol.* **164**, 969–979.
- Liu, Y., Ren, D., Pike, S., Pallardy, S., Gassmann, W. and Zhang, S. (2007b) Chloroplast-generated reactive oxygen species are involved in hypersensitive response-like cell death mediated by a mitogen-activated protein kinase cascade. *Plant J.* **51**, 941–954.
- Marois, E., van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (2002) The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 637–646.
- Maxwell, S.A. and Rivera, A. (2003) Proline oxidase induces apoptosis in tumor cells, and its expression is frequently absent or reduced in renal carcinomas. *J. Biol. Chem.* **278**, 9784–9789.
- Mercke, P., Kappers, I.F., Verstappen, F.W., Vorst, O., Dicke, M. and Bouwmeester, H.J. (2004) Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiol.* **135**, 2012–2024.
- Miao, Y., Laun, T.M., Smykowski, A. and Zentgraf, U. (2007) Arabidopsis MEK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant Mol. Biol.* **65**, 63–76.
- Multani, D.S., Briggs, S.P., Chamberlin, M.A., Blakeslee, J.J., Murphy, A.S. and Johal, G.S. (2003) Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize br2 and sorghum dw3 mutants. *Science*, **302**, 81–84.
- Naito, Y., Fujie, M., Usami, S., Murooka, Y. and Yamada, T. (2000) The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*. *Plant Physiol.* **124**, 1087–1096.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Umezawa, T., Ishida, J., Nakajima, M., Enju, A. and Shinozaki, K. (2004) Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in Arabidopsis: analysis of gene expression in cytochrome P450 gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Mol. Biol.* **55**, 327–342.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and Jones, J.D. (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* **135**, 1113–1128.
- Noh, B., Murphy, A.S. and Spalding, E.P. (2001) Multidrug resistance-like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell*, **13**, 2441–2454.
- Nosedá, M. and Karsan, A. (2006) Notch and minichromosome maintenance (MCM) proteins: integration of two ancestral pathways in cell cycle control. *Cell Cycle*, **5**, 2704–2709.
- O'Grady, K., Goekjian, V.H., Naim, C.J., Nagao, R.T. and Key, J.L. (2001) The transcript abundance of GmGT-2, a new member of the GT-2 family of transcription factors from soybean, is down-regulated by light in a phytochrome-dependent manner. *Plant Mol. Biol.* **47**, 367–378.
- Oh, S.K., Lee, S., Yu, S.H. and Choi, D. (2005) Expression of a novel NAC domain-containing transcription factor (CaNAC1) is preferentially associated with incompatible interactions between chili pepper and pathogens. *Planta*, **222**, 876–887.

- Oh, S.K., Yi, S.Y., Yu, S.H., Moon, J.S., Park, J.M. and Choi, D. (2006) CaWRKY2, a chili pepper transcription factor, is rapidly induced by incompatible plant pathogens. *Mol. Cells*, **22**, 58–64.
- Paal, J., Henselewski, H., Muth, J., Meksem, K., Menéndez, C.M., Salamini, F., Ballvora, A. and Gebhardt, C. (2004) Molecular cloning of the potato Gro1–4 gene conferring resistance to pathotype Ro1 of the root cyst nematode *Globodera rostochiensis*, based on a candidate gene approach. *Plant J.* **38**, 285–297.
- Park, W.J., Kriechbaumer, V., Moller, A., Piotrowski, M., Meeley, R.B., Gierl, A. and Glawischnig, E. (2003) The Nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.* **133**, 794–802.
- Parniske, M. and Jones, J.D. (1999) Recombination between diverged clusters of the tomato Cf-9 plant disease resistance gene family. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 5850–5855.
- Pastuglia, M., Swarup, R., Rocher, A., Saindrenan, P., Roby, D., Dumas, C. and Cock, J.M. (2002) Comparison of the expression patterns of two small gene families of S gene family receptor kinase genes during the defence response in *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, **282**, 215–225.
- Petricka, J.J. and Nelson, T.M. (2007) Arabidopsis nucleolin affects plant development and patterning. *Plant Physiol.* **144**, 173–186.
- Polge, C. and Thomas, M. (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* **12**, 20–28.
- Pontvianne, F., Matía, I., Douet, J., Tourmente, S., Medina, F.J., Echeverria, M. and Sáez-Vásquez, J. (2007) Characterization of AtNUC-L1 reveals a central role of nucleolin in nucleolus organization and silencing of AtNUC-L2 gene in Arabidopsis. *Mol. Biol. Cell.* **18**, 369–379.
- Reddy, A.M., Reddy, V.S., Scheffler, B.E., Wienand, U. and Reddy, A.R. (2007) Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential. *Metab. Eng.* **9**, 95–111.
- Ren, D., Yang, K.Y., Li, G.J., Liu, Y. and Zhang, S. (2006) Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. *Plant Physiol.* **141**, 1482–1493.
- Richman, A.S., Gijzen, M., Starratt, A.N., Yang, Z. and Brandle, J.E. (1999) Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *Plant J.* **19**, 411–421.
- Robertson, M. (2004) Two transcription factors are negative regulators of gibberellin response in the HvSPY-signaling pathway in barley aleurone. *Plant Physiol.* **136**, 2747–2761.
- Rocher, A., Dumas, C. and Cock, J.M. (2005) A W-box is required for full expression of the SA-responsive gene SFR2. *Gene*, **344**, 181–192.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T., Strauss, T., Bonas, U. and Lahaye, T. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science*, **318**, 645–648.
- Rooney, H.C., Van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A., Joosten, M.H., Jones, J.D. and de Wit, P.J. (2005) Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, **308**, 1783–1786.
- Roxrud, I., Lid, S.E., Fletcher, J.C., Schmidt, E.D. and Opsahl-Sorteberg, H.G. (2007) GASA4, one of the 14-member Arabidopsis GASA family of small polypeptides, regulates flowering and seed development. *Plant Cell Physiol.* **48**, 471–483.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarowar, S., Oh, H.W., Cho, H.S., Baek, K.H., Seong, E.S., Joung, Y.H., Choi, G.J., Lee, S. and Choi, D. (2007) *Capsicum annuum* CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J.* **51**, 792–802.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jurgens, G. and Hulskamp, M. (2002) TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in Arabidopsis. *EMBO J.* **21**, 5036–5046.
- Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S. and Paul, M. (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 6849–6854.
- Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M. and Smeekens, S. (2004) Trehalose mediated growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol.* **135**, 879–890.
- Shima, T., Imamula, K., Kon, T., Ohkura, R. and Sutoh, K. (2006) Head-head coordination is required for the processive motion of cytoplasmic dynein, an AAA+ molecular motor. *J. Struct. Biol.* **156**, 182–189.
- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C.J., Ono, K., Toki, S. and Takatsuji, H. (2007) Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell*, **19**, 2064–2076.
- Shiotani, H., Fujikawa, T., Ishihara, H., Tsuyumu, S. and Ozaki, K. (2007) A *pthA* homolog from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* responsible for host-specific suppression of virulence. *J. Bacteriol.* **189**, 3271–3279.
- Shubert, T.S., Rizvi, S.A., Sun, X., Gottwald, T.R., Graham, J.H. and Dixon, W.N. (2003) Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida again. *Plant Dis.* **85**, 340–356.
- da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., et al. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, **417**, 459–463.
- Spaink, H.P. (2004) Specific recognition of bacteria by plant LysM domain receptor kinases. *Trends Microbiol.* **12**, 201–204.
- Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C. and Suza, W. (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*, **17**, 616–627.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 435–459.
- Stevens, R., Mariconti, L., Rossignol, P., Perennes, C., Cella, R. and Bergounioux, C. (2002) Two E2F sites in the Arabidopsis MCM3 promoter have different roles in cell cycle activation and meristematic expression. *J. Biol. Chem.* **277**, 32978–32984.
- Straub, B.K., Boda, J., Kuhn, C., Schnoelzer, M., Korf, U., Kempf, T., Spring, H., Hatzfeld, M. and Franke, W.W. (2003) A novel cell-cell junction system: the cortex adhaerens mosaic of lens fiber cells. *J. Cell. Sci.* **116**, 4985–4995.
- Sugimoto, K., Takeda, S. and Hirochika, H. (2000) MYB-related transcription factor NtMYB2 induced by wounding and elicitors is a regulator of the tobacco retrotransposon Tto1 and defense-related genes. *Plant Cell*, **12**, 2511–2528.
- Swarbrick, P.J., Schulze-Lefert, P. and Scholes, J.D. (2006) Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant Cell Environ.* **29**, 1061–1076.

- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M.T. and Gabriel, D.W. (1992) An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**, 204–213.
- Takahashi, Y., Nasir, K.H., Ito, A., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kamoun, S. and Terauchi, R. (2007) A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. *Plant J.* **49**, 1030–1040.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C. and Machida, Y. (2001) A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in Arabidopsis embryos and juvenile plants. *Development*, **128**, 4681–4689.
- Tanaka, H., Ishikawa, M., Kitamura, S., Takahashi, Y., Soyano, T., Machida, C. and Machida, Y. (2004) The AtNACK1/HINKEL and STUD/TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis. *Genes Cells*, **9**, 1199–1211.
- Tapia, G., Verdugo, I., Yañez, M., Ahumada, I., Theoduloz, C., Cordero, C., Poblete, F., González, E. and Ruiz-Lara, S. (2005) Involvement of ethylene in stress-induced expression of the TLC1.1 retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun. *Plant Physiol.* **138**, 2075–2086.
- Trainotti, L., Spolaore, S., Pavanello, A., Baldan, B. and Casadoro, G. (1999) A novel E-type endo-beta-1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Mol. Biol.* **40**, 323–332.
- Truman, W., de Zabala, M.T. and Grant, M. (2006) Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *Plant J.* **46**, 14–33.
- Vlachonasios, K.E., Thomashow, M.F. and Triezenberg, S.J. (2003) Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect Arabidopsis growth, development, and gene expression. *Plant Cell*, **15**, 626–638.
- Vom Endt, D., Soares e Silva, M., Kijne, J.W., Pasquali, G. and Memelink, J. (2007) Identification of a bipartite jasmonate-responsive promoter element in the *Catharanthus roseus* ORCA3 transcription factor gene that interacts specifically with AT-Hook DNA-binding proteins. *Plant Physiol.* **144**, 1680–1689.
- Walters, D.R. and McRoberts, N. (2006) Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends Plant Sci.* **11**, 581–586.
- Wang, Y.S., Pi, L.Y., Chen, X., Chakrabarty, P.K., Jiang, J., De Leon, A.L., Liu, G.Z., Li, L., Benny, U., Oard, J., Ronald, P.C. and Song, W.Y. (2006) Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell*, **18**, 3635–3646.
- Wei, F., Wing, R.A. and Wise, R.P. (2002) Genome dynamics and evolution of the Mla (powdery mildew) resistance locus in barley. *Plant Cell*, **14**, 1903–1917.
- Weterings, K., Apuya, N.R., Bi, Y., Fischer, R.L., Harada, J.J. and Goldberg, R.B. (2001) Regional localization of suspensor mRNAs during early embryo development. *Plant Cell*, **13**, 2409–2425.
- Wichmann, G. and Bergelson, J. (2004) Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics*, **166**, 693–706.
- Wilson, R.A., Jenkinson, J.M., Gibson, R.P., Littlechild, J.A., Wang, Z.Y. and Talbot, N.J. (2007) Tps1 regulates the pentose phosphate pathway, nitrogen metabolism and fungal virulence. *EMBO J.* **26**, 3673–3685.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D. and Chua, N.H. (2000) Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* **14**, 3024–3036.
- Xu, X., Chen, C., Fan, B. and Chen, Z. (2006) Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell*, **18**, 1310–1326.
- Yang, H., Yang, S., Li, Y. and Hua, J. (2007) The Arabidopsis BAP1 and BAP2 genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol.* **145**, 135–146.
- Yang, Y. and Klessig, D.F. (1996) Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 14972–14977.
- Yip, W.K. and Yang, S.F. (1988) Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. *Plant Physiol.* **88**, 473–476.
- Zheng, H., Bednarek, S.Y., Sanderfoot, A.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Raikhel, N.V. (2002) NPSN11 is a cell plate-associated SNARE protein that interacts with the syntaxin KNOLLE. *Plant Physiol.* **129**, 530–539.
- Zhuang, X., Xu, Y., Chong, K., Lan, L., Xue, Y. and Xu, Z. (2005) OsAGAP, an ARF-GAP from rice, regulates root development mediated by auxin in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* **28**, 147–156.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 Differential expression of cell-wall-remodelling genes between Xac- and Xaa-infected leaves analysed by Northern blot. Total RNA extracted from sweet orange leaves 48 h after Xac or Xaa infiltration was hybridized to DNA fragments corresponding to endo-beta glucanase (CV886058), acidic cellulase (AAB56555), pectinesterase (CN181845) and expansin (DN621554).

Fig. S2 Expression levels of a putative cysteine protease (DN623815) in sweet orange (Pêra) and Mexican lime plants infected with Xac or Xaa at 48 hpi, determined by qRT-PCR.

Table S1 *C. sinensis* genes with altered expression in response to Xac or Xaa infection identified by DD and/or SSH and validated by qRT-PCR. Fold change in gene expression relative to water-infiltrated leaves (= 1.0) is the average of three qRT-PCR measurements. Positive and negative values represent up- and down-regulation, respectively- and 'nd' means quantification not determined. *Citrus* ESTs that showed a perfect match with probesets of the Affymetrix citrus array are shown in bold, whereas bold-underlined indicates ESTs that were represented in the citrus array but were not detected in the microarray experiments. Fold change values of Xac versus Xaa at 48 hpi, determined by microarray, are shown for comparison with the qRT-PCR measurements.

Table S2 Sweet orange genes regulated by Xac relative to Xaa at 48 hpi with fold change = 2.0.

Table S3 Sweet orange genes specifically regulated by Xac at 48 hpi with fold change = 3.0.

Table S4 Sweet orange genes specifically regulated by Xaa at 48 hpi with fold change = 3.0.

Table S5 Sweet orange genes regulated by Xac relative to Xaa at 6 hpi with fold change = 2.0.

Table S6 Sweet orange genes specifically regulated by Xac at 6 hpi with fold change = 3.0.

Table S7 Sweet orange genes specifically regulated by Xaa at 6 hpi with fold change = 3.0.

Table S8 Sweet orange genes commonly regulated by Xac and Xaa at 6 hpi, relative to water-infiltrated leaves, with fold change = 3.0.

Table S9 Sweet orange genes commonly regulated by Xac and Xaa at 48 hpi, relative to water-infiltrated leaves, with fold change = 3.0.

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES DO CAPITULO I

Nesta seção se relatam em detalhe os experimentos correspondentes ao capítulo I desta Tese. Além disso, descre-se outras experiências como a construção de uma biblioteca de cDNA de laranja doce que foi utilizada durante experimentos de duplo híbrido em leveduras usando-se a proteína de virulência de Xac, PthA, como “isca”.

Material biológico e inoculação das plantas

Mudas de laranja Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) com idade de entre 4 e 6 meses foram obtidas de viveiros da região e acondicionadas em salas de crescimento equipadas com luz branca fluorescente, sob condições controladas de foto período (14 h de luz) e temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

O isolado 306 de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (da Silva et al., 2002) e isolado 434 de *X. axonopodis* pv *aurantifolii* (patotipo C), obtido da coleção de culturas de fitobactérias da seção de fitobacteriologia do Instituto Biológico (IBSBF) do Centro Experimental de Campinas, foram crescidas em meio LB sólido sem adição de NaCl (LBON) durante 48 h a 28°C . As bactérias foram coletadas mediante a raspagem das placas e ressuspensas em água estéril a fim de se obter uma densidade de aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colônias por mililitro (equivalente a $\text{OD}_{600\text{nm}}=0,6$). Folhas de laranja sadias foram infiltradas em áreas alternadas usando-se uma seringa descartável de 1 mL. As plantas inoculadas foram mantidas em sala de crescimento até a colheita das folhas 6 ou 48 hs após inoculação. Tais folhas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para o posterior isolamento de RNA.

Extração do RNA total e purificação de mRNA

Folhas de laranja Pêra infiltradas com Xac ou Xaa foram maceradas em nitrogênio líquido até a formação de pó e posteriormente solubilizado no reagente Trizol de acordo com as recomendações do fabricante (INVITROGEN). O RNA total foi precipitado com LiCl (4M), ressuspensionado em H_2O -DEPC e re-precipitado com (0.1 volumes) de Acetato de Sódio (3M) e (3 volumes) de etanol 100%, lavado com etanol 70 % e finalmente, ressuspensionado em H_2O -DEPC. Em seguida, realizou-se o isolamento dos poly(A)⁺RNA (RNAs mensageiros) mediante o Kit “Fast Track 2.0” (INVITROGEN). As amostras de mRNA foram ressuspensas em H_2O -DEPC e guardadas a -80°C . Para realizar a síntese de cDNA utilizou-se 0,5 µg de mRNA poliA⁺ segundo as recomendações no kit SuperScriptII (INVITROGEN).

Construção de biblioteca de cDNA de folhas de laranja Pêra

A construção de uma biblioteca de cDNA de folhas de laranja Pêra foi realizada utilizando-se o kit *SuperScript Plasmid System* (INVITROGEN). Os cDNAs foram sintetizados a partir de mRNAs isolados de folhas de laranja infiltradas com Xac, para serem clonados no vetor de duplo híbrido pOAD (o vetor pOAD expressa o fragmento clonado em fusão com um domínio de ativação de transcrição, *Activation Domain*). Seguiu-se o protocolo de síntese de cDNA de acordo com as instruções do fabricante, exceto que as ligações dos adaptadores foram realizadas usando-se a enzima T4 DNA *ligase* (NEW ENGLAND BIOLABS), que possui maior atividade que a fornecida no kit. Os cDNAs sintetizados contém os adaptadores *SalI* e *NotI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente, que auxiliam à clonagem direcional dos fragmentos no vetor pOAD previamente digerido com *SalI/NotI*. Células de *E. coli* DH5α eletrocompetentes foram transformadas com o produto da ligação entre cDNA e vetor e plaqueadas em meio contendo carbamicilina (100mg/L). Aproximadamente 600 mil colônias, a grande maioria recombinantes, foram obtidas após aproximadamente 100 transformações (Figura 4).

Tais clones foram coletados (raspados) a partir das placas para compor a biblioteca, que foi aliquotada em “pools” contendo uma concentração de glicerol de 15% para estocagem a -80°C.

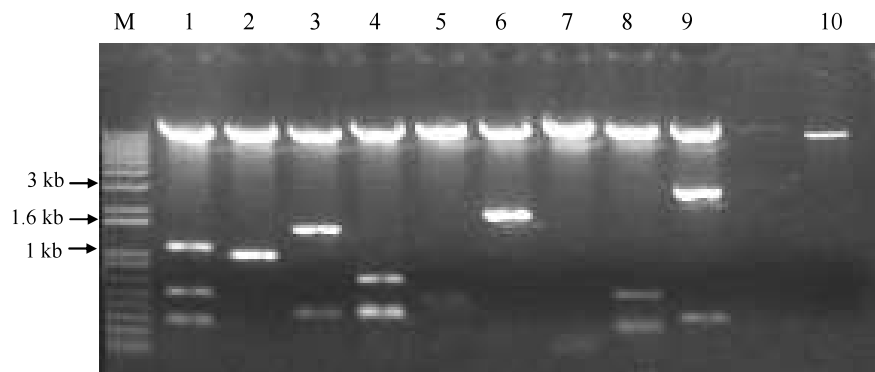


Figura 4. Exemplo de clones da Biblioteca de cDNA de folhas de laranja Pêra que foram digeridos com *PstI* e *EcoRI*. O gel mostra que mais do 70 % dos clones escolhidos são recombinantes (canaletas 1 a 9). M: marcador de peso molecular; 10: pOAD (*PstI* - *EcoRI*) não recombinante.

Clonagem de genes *pthA* para varredura da biblioteca de cDNA de laranja

Os primeiros genes de virulência de Xac em serem clonados, *pthA2* e *pthA3*, foram utilizados como “iscas” para a varredura da biblioteca de cDNA. As iscas foram isoladas a partir de DNA total de Xac mediante PCR com oligos específicos contendo os sítios *NdeI* e *EcoRI*. O produto de PCR, em torno a 3.5 kb, foi digerido com *NdeI* /*EcoRI* e clonado no

vetor pet28a (NOVAGEN) digerido com as mesmas enzimas. A partir disso, subclonou-se os *pthAs* no vetor de duplo híbrido pOBD, que expressa a proteína “isca” em fusão com um domínio de ligação a DNA (*Binding Domain*). Como os oligos utilizados não distinguem as variantes de *pthAs*, foi feito um mapa de restrição com *SspI* que permite discriminar os quatro *pthAs* codificados no genoma da Xac, *pthA1*, *pthA2*, *pthA3* e *pthA4* (da Silva et al., 2002). Assim, inicialmente estabeleceram-se três “iscas”, pOBD-*pthA3*, pOBD-*pthA2* e pOBD-*pthA2-Cterminal*. Posteriormente, os clones foram verificados por seqüenciamento de DNA.

Por conveniência, a clonagem das “iscas” foi realizada no sítio *NotI* deletando-se a porção N-terminal de ambos *pthAs*, já que a região deletada (385pb) não é necessária para o desenvolvimento dos sintomas do cancro (Szurek et al., 2001). Além de *pthA2* e *pthA3*, a porção C-terminal (795pb) de *pthA2*, importante por conter os domínios de localização nuclear (NLS) e o domínio transativador (AAD), também foi clonada em pOBD. O “screening” de duplo híbrido foi realizado no Instituto de Química da USP (São Paulo), em colaboração com a Dra. Cássia Docena e o Prof. Chuck Farah.

Ensaio de duplo-híbrido em levedouras

Foi utilizada a cepa PJ694-a de *Sacharomyces cerevisiae* levando as respectivas “iscas” *pthA2s* e *pthA3* no vetor pOBD. Essas leveduras foram transformadas com os plasmídios extraídos da biblioteca de cDNA (*maxi-prep*) como descrito por Alegria et al. (2004). Todos os experimentos de transformação de levedura, ensaios de auto-ativação das iscas e “screening” de duplo-híbrido foram realizados no Instituto de Química (USP - SP). Vários clones candidatos foram isolados com as duas variantes de *pthAs*, entretanto, a varredura com a isca *pthA2-Cterminal* não foi realizada devido a que apresentou forte auto-ativação. Os plasmídios pOADs recombinantes contendo as “presas” de *pthA* foram purificados e seqüenciados.

Na primeira varredura da biblioteca de citros, usando-se as iscas PthA2 e PthA3, foram isolados vários cDNAs de grande interesse, entre eles, se destacam:

- 1) O receptor nuclear, α -importina, indicando que o mecanismo de importação nuclear de PthA é similar ao antes relatado para AvrBs3 em pimentão (Szurek et al., 2001)
- 2) Ciclofilina – Participa do enovelamento de proteínas em complexos com chaperoninas HSP70 e HSP90 promovendo a isomerização de resíduos de Prolina (Ward et al., 2002; Carrello et al., 2004; Coaker et al., 2005).

- 3) HIP-TRX (*HSP70-interacting protein-thioredoxin chimera*) que está relacionada funcionalmente à ciclofilina por participar no enovelamento de proteínas nos complexos HSP70/90. Notavelmente, a interação entre HSP70/90, HIP e ciclofilina já foi descrita em mamíferos (Carrello et al., 2004)
- 4) HID/PrmC3 – Esterase relacionada à resposta de HR em tabaco.
- 5) Cisteína protease – Envolvida em resistência contra fungos (Krüger et al., 2002). Curiosamente é o mesmo EST de citros que foi induzido por Xac em laranja doce durante o desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico (Cernadas et al., 2008a)
- 6) Proteína de estresse hídrico – Função desconhecida, mas tem domínio de ligação de RNA.
- 7) Fator de resposta à auxina – Fator de transcrição envolvido em respostas à auxina.
- 8) Proteína com domínio HMG (*high mobility group*) – Provável fator de transcrição.
- 9) Uev1a – Enzima conjugadora de ubiquitina variante 1a.

Proteínas de citros que interagem com o efector PthA de Xac

Além dos candidatos descritos acima, vários outros clones foram identificados e isolados em posteriores varreduras da biblioteca de cDNA. O destaque é para o receptor nuclear α -importina que, da mesma forma que ocorre para o ortólogo AvrBs3, a interação de PthA com esse receptor deve ser necessária para sua importação para o núcleo. A interação de PthA com α -importina foi utilizado como controle positivo durante nossos experimentos de duplo híbrido.

Embora esses resultados obtidos através de duplo híbrido são de grande importância para desvendar o mecanismo de virulência do efector PthA, eles não estão no foco principal desta tese e serão descritos em profundidade em outros trabalhos futuros de nosso laboratório. No entanto, com o intuito de caracterizar as primeiras interações com PthA, foram escolhidos cinco clones. Uma proteína similar a ciclofilina (*peptidyl-prolyl isomerase*), uma tioredoxina semelhante à HIP (*HSP70-interacting protein*), uma cisteína protease (CP), uma proteína semelhante à *ubiquitin conjugating enzyme* variante 1a, e uma esterase (PrmC3) relacionada à resposta de HR.

Analisando-se a função dessas proteínas podemos supor que PthA necessite de transformações pós-traducionais, como isomerização de Prolina (PthA é rico em prolinas no domínio central, necessário para o reconhecimento da hospedeira), hidrolise pela CP e transporte para o núcleo mediado pela α -importina, como já mencionado.

Uma vez que alguns dos clones isolados da biblioteca de citros no pOAD estavam truncados no N-terminal ou no frame +2 em relação a fusão com o domínio Gal4 (*activation domain*), os respectivos genes inteiros foram isolados por RT-PCR a partir de mRNA de *C. sinensis* e posteriormente clonados. No caso da α -importina, entretanto, foi clonada sem o N-terminal em virtude do tamanho e hidrofobicidade desse domínio. A aplicação do duplo-híbrido usando as presas no frame correto ou o clone inteiro permitiu confirmar a interação de PthA2 com ciclofilina, PrmC3 e α -importina (Figura 5).

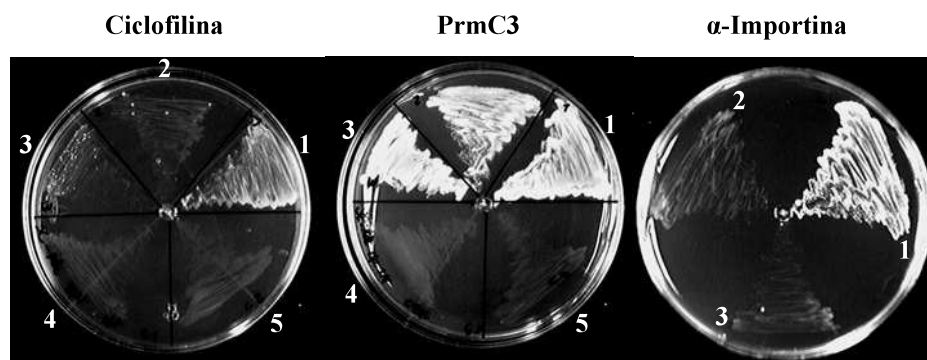


Figura 5. Duplo-híbrido em leveduras mostrando a interação entre proteínas de citros com PthA2. Os clones foram plaqueados em meio SC sem Adenina, Leucina, Triptofano e Histidina (Alegria et al., 2004). 1, 2 e 3 clones independentes (isca + presa), 4 (isca + pOAD vazio), 5 (presa + pOAD vazio); α -Importina 1 (isca + presa), 2 (isca + pOAD vazio) e 3 (presa + pOAD vazio).

A maioria das interações descritas acima para PthA2 e PthA3 foi confirmada em nosso laboratório e atualmente é foco de três trabalhos de doutorado. Estes resultados atraentes, acoplados à análise da expressão diferencial em resposta a Xac, deverão trazer nova luz para o entendimento da função de efetores de virulência de bactérias fitopatogênicas.

Detalhes da construção das bibliotecas subtrativas (SSH)

A técnica de hibridação subtrativa suprimida foi utilizada para comparar populações de mRNAs isolados a partir de folhas de laranja após 48 h da infiltração com Xac ou Xaa. Para isso, as plantas foram infiltradas com uma suspensão das bactérias e, após o tempo determinado (6 ou 48 hai), as folhas foram colhidas e congeladas em nitrogênio líquido para isolamento de RNA. A seguir, os cDNAs correspondentes foram sintetizados e digeridos com a enzima *Nla*III (CATG). Os produtos da digestão com tamanhos menores a 1 kb foram purificados a partir de gel de Agarose (1%). Ao invés de utilizar os adaptadores fornecidos no Kit de SSH (CLONTECH - k1804), que estipula uma ligação *blunt-ended*, decidiu-se desenhar outro tipo de adaptadores (Figura 6).



Figura 6. Sequência dos adaptadores utilizados neste protocolo indicando os sítios para os oligos T7 e Nested. Os sítios *EcoRI* e *PstI* foram inseridos nos adaptadores 1 e 2 respectivamente. A ligação do Adaptador é feita através do pareamento com o extremo 3' protuberante do produto de digestão com *NlaIII*.

Esses novos adaptadores foram ligados, como indica a Tabela 2, para gerar as populações chamadas de *Tester* ou *Driver*.

Tabela 2. Ligação de adaptadores para gerar as amostras *Tester* e *Driver*

	Adaptador 1	Adaptador 2	s/Adaptador
cDNA folhas com Xac	Tester 1-1	Tester 1-2	Driver 1
cDNA folhas com Xaa	Tester 2-1	Tester 2-2	Driver 2

Obteve-se uma grande eficiência na ligação de adaptadores aplicando esta nova estratégia. A ligação do adaptador é essencial para conseguir bons resultados durante o processo de subtração da técnica SSH. Evidentemente, esta metodologia foi muito mais conveniente que a ligação *blunt ended* (inicialmente realizada sem sucesso). A Figura 7 mostra o produto de PCR de várias colônias individuais escolhidas ao acaso, após a subtração e que compõem a biblioteca *forward* ou *reversa*. Para este experimento, usou-se os oligos Nested ou M13F (e M13R) específicos do vetor pGEM T (PROMEGA), verificando-se que a maioria dos clones possuem os adaptadores 1 e 2 nas extremidades.

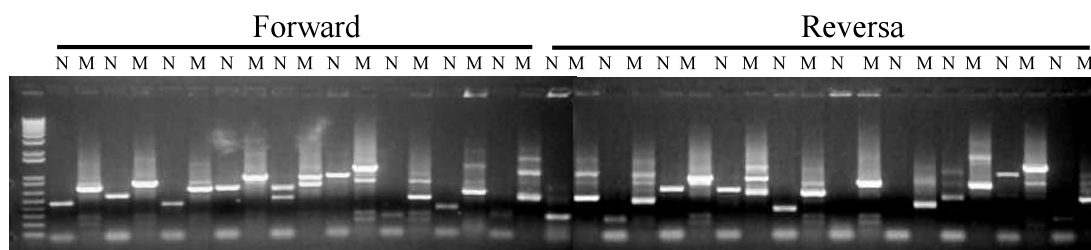


Figura 7. Gel de agarose 1% mostrando produtos de PCR de clones das bibliotecas *forward* e *reversa* selecionados ao acaso. Foram usados os oligos Nested 1 e 2 (N) ou M13F e R (M), para montar a reação. Mais de 90% dos cDNAs foram amplificados com os oligos Nested.

Clones recombinantes (colônias brancas em placas contendo X-gal) das bibliotecas *forward* e *reversa* foram depositados por duplicata sobre membranas de nylon e hibridizados com as sondas subtraídas segundo as instruções do fabricante (CLONTECH - k1804). A marcação das sondas se levou a cabo com o *Megaprime DNA labelling system* (AMERSHAM BIOSCIENCES) e previamente à hibridação das membranas, as sondas foram digeridas com *NlaIII* para eliminar os adaptadores e assim reduzir o *background* (Experimento de *dot blot* sugerido no manual do kit). As membranas foram hibridizadas “overnight” a 65°C, lavadas para remoção do excesso de sonda, mantidas em contato com membranas IP por tempo variado e analisadas num “Phosphoimager” (Figura 8). No total, foram preparadas e analisadas 10 membranas contendo duplicatas de 960 clones da biblioteca *forward* e 10 contendo o mesmo número de clones da biblioteca *reversa* (Figura 8). O “*screening*” primário de *dot blot* permitiu o isolamento e posterior seqüenciamento de 48 cDNAs da biblioteca *forward* e 33 da biblioteca *reversa*.

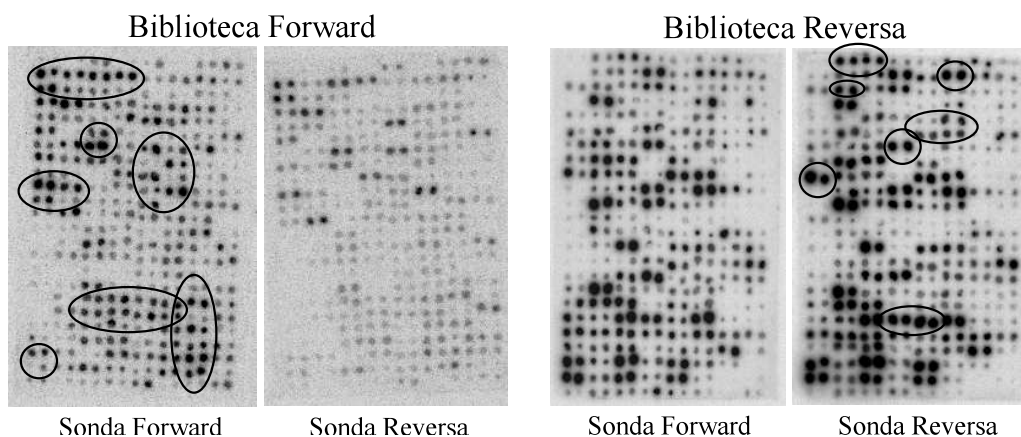


Figura 8. Clones das bibliotecas *forward* e *reversa* amplificados com os oligos Nested 1 e 2 e, hibridizados com as respectivas sondas. Nota-se claramente um sinal de hibridização maior nas membranas hibridizadas com a sonda correspondente, principalmente na biblioteca *forward*, indicando que houve subtração. Clones diferencialmente expressos estão indicados pelos balões.

Detalhes do display diferencial de PCR (DD PCR)

A técnica de DD PCR (Liang et al., 1992) também foi usada para a identificação e clonagem de fragmentos de cDNAs diferencialmente expressos em folhas de laranja infiltradas com Xac ou Xaa após 48hs da infecção. Cerca de 80 combinações de oligos decâmeros com seqüências randômicas foram usadas para amplificar fragmentos a partir das duas populações de cDNAs (infiltrada com Xac ou Xaa). A Figura 9 mostra uma fotografia de dois géis de poliácridamida 6% contendo os produtos do DD PCR, junto com a identificação de bandas diferencialmente expressas entre os tratamentos. Essas bandas

foram removidas dos géis, re-amplificadas, clonadas em vetor pGEM e três clones de cada transformação, escolhidos ao acaso, foram seqüenciados. Na maioria dos casos, os três clones apresentaram seqüências idênticas. Nos casos onde apareciam mais de uma seqüência distinta, todas eram separadas para serem validadas por *Northern* ou PCR quantitativo em tempo real.

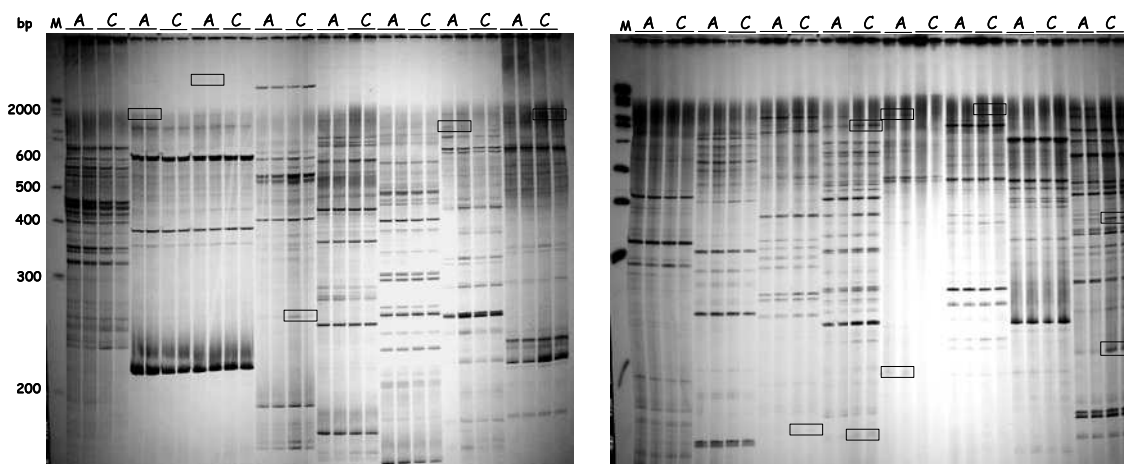


Figura 9. Gel de poliacrilamida 6% (não-denaturante) do DD PCR de mRNAs extraídos de folhas de laranja infiltradas com Xac (C) ou Xaa (A) após 48h. Cada amostra foi amplificada em duplicata para eliminar possíveis falsos positivos. Bandas diferencialmente expressas entre as amostras de Xac e Xaa estão indicadas pelos retângulos, e o marcador de peso molecular está indicado em pares de base (bp).

No total, 68 genes foram isolados por DD PCR. De forma semelhante aos clones isolados das bibliotecas SSH, os clones identificados por DD PCR foram validados por PCR quantitativo em tempo real ou por *Northern* blot.

A Tabela S1 mostra a lista dos genes identificados por DD PCR e SSH com expressão aumentada por Xac ou Xaa. Nessa tabela, nota-se que alguns dos genes isolados independentemente por DD PCR ou SSH são idênticos ou pertencem a uma mesma família gênica, ou ainda, apresentam funções relacionadas. Isso indica que tanto SSH como DD PCR produziram resultados semelhantes e complementares. Observa-se que muitos dos genes estão implicados, por similaridade de seqüência, em respostas de defesa de plantas ou associados ao desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico.

PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão diferencial de mais de 120 genes candidatos foi confirmada utilizando a técnica de qPCR com *SYBR Green* como sonda. *SYBR Green* é uma sonda que se intercala na dupla fita de DNA durante a etapa de anelamento do PCR e, nessa condição, emite fluorescência que resulta quantificada no detector do aparelho. O produto acumulado ciclo

a ciclo durante a reação de PCR é quantificado através do incremento da fluorescência emitida pela sonda. A grande vantagem de utilizar este tipo de sonda é a economia do experimento para um grande número de genes a serem validados. Por outro lado, a desvantagem do uso de *SYBR green* é que não garante tanta especificidade quanto o uso de outras sondas como o exemplo *Taq man*. Por causa disso, antes de começar o qPCR, duplas de oligos desenhadas para vários genes candidatos foram testadas mediante PCR para verificar a amplificação de um único produto.

A técnica de qPCR é altamente sensível e portanto é necessário eliminar qualquer contaminação exógena de DNA para realizar a medida sem correr riscos de mascarar os resultados com amplificações inespecíficas. Para isto, analisou-se a eficiência do tratamento de RNA com *DnaseI* antes da síntese de cDNA, verificando a hidrólise completa de possíveis contaminações com DNA genômico. Neste caso também várias duplas de oligos selecionados ao acaso foram utilizados para mostrar a eficiência do tratamento com *DnaseI* (Figura 10).

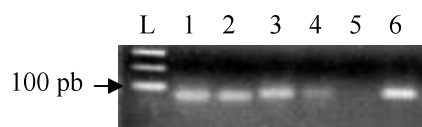


Figura 10. Gel de agarose 1.5 % mostrando a eficiência de tratamento com *DNaseI* (o experimento foi estendido para outros 5 candidatos, escolhidos ao acaso, com resultados similares). L: *ladder*, 1 e 4: RNA total, 2 e 5: RNA total tratado com *DNaseI*, 3 e 6: cDNA 1ª fita. (1, 2 e 3: *Taq Pol* normal; 4, 5 e 6: *Taq Platinum*).

O produto de PCR presente na caneleta 2 pode ser devido à amplificação de dímeros de oligos, pois desaparece no “*hot start*” PCR (Figura 10).

A seguir, as reações de qPCR foram montadas em placas de 96 poços, colocando ademais, os respectivos controles sem DNA molde. Os resultados obtidos a partir de qPCR, correspondem à média de três réplicas para cada amostra. Os primeiros experimentos de qPCR foram realizados com o apoio do Prof. Ivan Maia e a Dra. Andréa Akemi do departamento de genética da UNESP (Botucatu, SP).

A Figura 11 mostra a interface gráfica após a corrida do qPCR para uma dupla de oligos desenhada contra uma celulase ácida de citros. Pode-se apreciar a amplificação diferencial (esquerda) junto com a curva de dissociação típica correspondente à um único produto amplificado (direita).

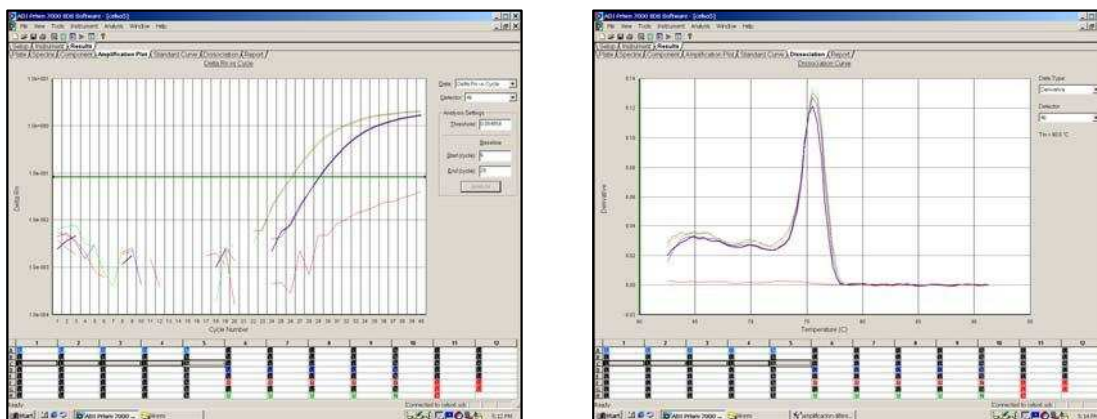


Figura 11. Análise de qPCR no ABI PRISM 7000 (*Applied Biosystems*). A) Gráfico de qPCR ciclo a ciclo. A ordenada representa a fluorescência acumulada durante a reação (ΔR_n vs. Cycle number), B) Curva de dissociação, este gráfico mostra que há unicamente um produto de PCR ($d\Delta R_n/dT$ vs. Temperature)

O EST CK937155 (proteína hipotética) de *Citrus sinensis* foi utilizado como controle interno para o qPCR, cuja expressão fora previamente verificada por *Northern* blot mostrando-se homogênea nos três tratamentos realizados (Figura 12). Além do EST CK937155, também foi usado um segundo controle interno como referência, o EST CX077830 similar a uma proteína ribossomal.

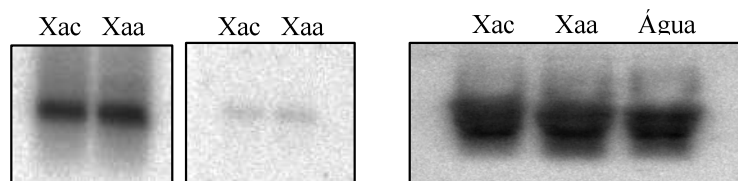


Figura 12. *Northern* blot da referencia interna (EST CK937155), o clone foi testado em várias membranas com mRNA de folhas infiltradas com Xac, Xaa ou água.

Curva de crescimento de Xac e Xaa em folhas de laranja Pêra

As bactérias Xac (isolado 306) e Xaa (isolado 434) foram crescidas em meio LB sólido sem adição de NaCl (LBON) suplementado com Ampicilina (100 mg/mL) durante 48 h a 28°C. As bactérias foram coletadas mediante a raspagem das placas e ressuspensas em água estéril até obter uma $OD_{600nm} = 0.40$ para Xac e, 0.58 para Xaa. Folhas de laranja sadias foram infiltradas com cada inóculo em três setores alternados de cada folha. As plantas inoculadas foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições descritas para experimentos anteriores deste trabalho. Cada uma das áreas infiltradas das folhas foram cortadas com um vazador (15 mm de diâmetro) e cada disco foi macerado individualmente em 1mL de tampão PBS 1X. A seguir, foram feitas sucessivas diluições

destes macerados (10^4 ; 10^5 ; 10^6 ; 10^7) as quais eram plaqueadas em LBON suplementado com Ampicilina (100 mg/mL). O número de colônias nas placas (três placas por cada diluição) foi contabilizado para a construção das curvas de crescimento. O experimento foi realizado duas vezes em plantas independentes obtendo-se resultados muito similares.

Identificação e clonagem de duas novas variantes de PthAs em Xaa

Plasmídios de Xac e Xaa foram purificados usando-se um kit comercial de minipreparação de DNA (QIAGEN) e usados como DNA “template” em reações de PCR. Cada reação era composta por: DNA molde (~25 ng), 0.2 μ M de cada oligo PthA1 (5'-gggatgccatatggatccc-3') e PthA2 (5'-tggaattcactgaggcaatagct-3'), 200 μ M dNTPs, 1x tampão *Taq Pfu* Turbo e 1U *Taq Pfu* Turbo (STRATAGENE) em 50 μ L de reação. As condições de PCR foram: 1 ciclo de 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 sec, 58°C por 30 sec, 72°C por 3 min. Os produtos de PCR foram separados em gel de Agarose 1% e, os fragmentos em torno de 3 a 3.5 kb foram purificados do gel, digeridos com *NdeI* e *EcoRI* e subclonados em vetor pET28a e pET29a previamente digeridos com as mesmas enzimas. O produto das ligações foi usado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α . Os plasmídios recombinantes foram identificados por seqüenciamento e digestão com *SspI*, que diferencia as isoformas de *pthAs*.

Dois clones diferentes similares a *pthA* foram amplificados com os mesmos oligos que foram usados para *pthA* a partir de DNA genômico e plasmidial de Xaa. Esses produtos foram clonados no vetor pET28a (*NdeI* e *EcoRI*) e seqüenciados. Em vinte clones seqüenciados e digeridos com *SspI*, foram detectadas apenas duas isoformas de “*pthC*”, homólogos de *pthA* (Figura 12). O seqüenciamento completo desses genes mostrou que a variante maior contém 17.5 repetições dos 34 amino ácidos do domínio central sendo portanto o equivalente a PthA4 de Xac. Porém, surpreendentemente, a variante menor apresenta 14.5 dessas repetições e define assim dois genes *PthCs* do isolado 434 de Xaa. Essa diferença, pode portanto, ser importante para explicar a patogenicidade diferencial entre Xaa e Xac. No momento, nosso laboratório está testando a hipótese se PthC de 14.5 repetições poderia causar HR em laranja doce.

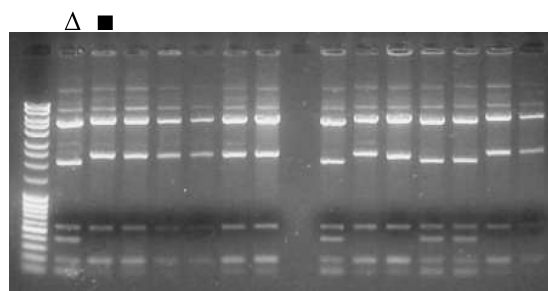


Figura 12. Gel de agarose mostrando o perfil da digestão de plasmídios pET28a contendo *PthBs* de Xaa isolado 434. Entre vários clones analisados, apenas dois padrões (Δ ou ■) de digestão com *SspI* foram observados, sugerindo a presença de apenas dois *PthCs* em Xaa 434.

Preparo das sondas para hibridizar a lâmina de microarranjos de DNA

Para a construção das sondas usou-se 0.5 µg mRNA junto com o kit “*One-Cycle Eukaryotic Target Labelling*” da Affymetrix para a síntese de cDNA, síntese de cRNA (transcrição *in vitro*) e purificação das sondas. Uma vez purificado e quantificado, utilizamos 15 µg de cRNA no “*hybridization cocktail*”. As lâminas foram hibridizadas durante 16 hs (45°C / 60 rpm) com três sondas diferentes: H₂O, Xaa e Xac.

Leitura das lâminas e análise dos resultados

Após a hibridização as lâminas foram lavadas (Wash Buffer A and B), coradas (“*stain cocktail 1 e 2*” e, finalmente “*Array Holding Buffer*”) e lidas num scanner GeneChip 3000 7G acoplado numa estação de lavagem GeneChip Fluidics Station 450. O GCOS (GeneChip Operating Software) controla a estação de lavagem assim como o scanner de leitura. Detalhes do protocolo, operação e uso da plataforma encontra-se no capítulo 4 do manual “*GeneChip Expression Analysis Technical Manual*”(AFFYMETRIX). Os experimentos foram feitos em duplicata (duas amostras biológicas diferentes) para cada uma das sondas (H₂O, Xaa e Xac) 6 hs e 48 hs após infiltração, gerando um total de 12 lâminas para a análise. Utilizou-se o software GCOS para obter os arquivos CEL e CHP de cada uma das lâminas que posteriormente foram analisadas e comparadas estatisticamente com o software “*ArrayAssist*” (STRATAGENE).

Análise de microarranjos de DNA

Amostras de mRNAs de folhas de laranja Pêra infiltradas com suspensões de Xac, Xaa ou água durante 6 hs e 48 hs foram usadas para hibridizar lâminas de citros (AFFYMETRIX *Citrus GeneChip*). Essas lâminas (*chips*) contém mais de 30 mil “*probesets*” que representam mais de 33 mil transcritos de citros. Em geral, as

hibridizações das lâminas detectaram mais de 70% dos *probesets*, que é uma frequência maior à aquela que normalmente se obtém com lâminas de mamíferos, ao redor de 50%.

Duas hibridizações usando lâminas independentes foram realizadas para cada tratamento (réplicas biológicas). Os dados como, normalização e correção da linha base foram convertidos através do algoritmo MAS5 (GCOS-AFFYMETRIX). O tratamento estatístico (*p-values*) foi feito mediante o software comercial *ArrayAssit* (STRATAGENE). Várias comparações foram feitas: Xac-água up e down-regulados, Xaa-água up e down-regulados, Xac-Xaa up e down regulados (Cernadas et al., 2008). Os resultados dessas análises confirmaram os dados obtidos com DD, SSH e qPCR. De forma geral, as principais vias alteradas em resposta à infecção por Xac/Xaa, descritas anteriormente através o DD e SSH, foram realçadas com as análises de microarray, uma vez que um número muito maior de genes com até 2 vezes de diferença de expressão foram encontrados para cada categoria de função. Porém, as análises de microarray revelaram diferenças marcantes na expressão diferencial de genes que podem explicar o diferencial de patogenicidade entre Xaa e Xac, o que não foi inteiramente possível com os dados de DD, SSH.

CAPITULO II

Examinar o efeito da aplicação exógena de Auxina ou Giberelina sobre a expressão de genes, i) envolvidos no metabolismo da parede celular, ii) transporte e sinalização de auxina e, iii) biosíntese de giberelina.

O capítulo II desta tese corresponde principalmente à análise transcricional de genes relacionados com o metabolismo da parede celular em resposta aos hormônios auxina e giberelina. Este trabalho se apresenta em forma de artigo científico como foi submetido na revista *Plant Physiology and Biochemistry* (Cernadas and Benedetti, 2008b).

O trabalho mostra que genes de remodelamento da parede celular que são fortemente induzidos por Xac também são, em alguns casos, induzidos pela aplicação exógena de auxina (NAA) ou giberelina (GA₃). Em conjunto se estabelece um elo entre as vias de sinalização de hormônios e a infecção por Xac. Além disso, resultados preliminares indicam que a acumulação de GA₃ promovida por NAA atua sinergicamente sobre a expressão de genes envolvidos no remodelamento da parede celular.

Ademais, apresentamos indícios de que em folhas infiltradas com Xac e Xaa existe uma sinalização pós transcricional mediada por microRNAs e que é controlada por auxinas, como está descrito na literatura para *Arabidopsis*. Observamos também a indução de genes que codificam para proteínas DICER, envolvidas com processamento de RNA, assim como a superexpressão do miRNA 160 e supressão do seu possível alvo, ARF10.

ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO:

Auxin and Gibberellin-mediated expression of cell wall remodeling
genes induced by *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Raúl Andrés Cernadas and Celso Eduardo Benedetti

PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY (2008)

Manuscript Number: PLAPHY-D-08-00130

Title: Auxin and Gibberellin-mediated expression of cell wall remodeling genes induced by *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Article Type: Research Paper

Keywords: citrus canker
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*
cell wall remodeling
auxin
gibberellin

Corresponding Author: Mr Celso Eduardo Benedetti, PhD

Corresponding Author's Institution: Brazilian Synchrotron Light Laboratory

First Author: Celso Eduardo Benedetti, PhD

Order of Authors: Celso Eduardo Benedetti, PhD

Abstract: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) is the bacterial pathogen responsible for citrus canker, a disease characterized by the formation of hyperplastic lesions on the surface of susceptible host. We have previously shown that, in sweet orange (*Citrus sinensis*) leaves, Xac strongly increases transcription of genes encoding cell wall remodeling and structural proteins and simultaneously alters the expression of genes associated with cell division and expansion. In addition, a number of Xac-regulated genes are implicated in the synthesis, mobilization and signaling of auxin and gibberellin. Since these hormones control cell division and elongation in several plant species, we examined their ability to modulate the expression of various Xac-regulated cellulases, pectinesterases, glycosyltransferase and expansin genes. Here, we show that all the analyzed genes were rapidly modulated by both exogenously applied NAA (naphthylacetic acid) and gibberellic acid (GA). Significantly, the NAA and GA-mediated regulation of cell wall genes correlated with an up-regulation of genes implicated in the synthesis of GA and auxin signaling, which are also induced in orange leaves upon Xac infection. An inhibitor of GA synthesis significantly

decreased transcription of some of the genes up-regulated by NAA, suggesting that a crosstalk between auxin and GA controls the expression of orange genes associated with cell division and expansion triggered by Xac.

Auxin and Gibberellin-mediated expression of cell wall remodeling genes induced by *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*

Raúl Andrés Cernadas¹ and Celso Eduardo Benedetti^{1*}

Address correspondence to: Celso E. Benedetti, Center for Molecular and Structural Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, R. Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, SP, CP6192, CEP 13083-970, Brazil, Tel. 55 19 35121111; Fax. 55 19 35121006; E-Mail: celso@lnls.br

Running title: Auxin and GA regulation of orange cell-wall remodeling genes

Abstract

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) is the bacterial pathogen responsible for citrus canker, a disease characterized by the formation of hyperplastic lesions on the surface of susceptible host. We have previously shown that, in sweet orange (*Citrus sinensis*) leaves, Xac strongly increases transcription of genes encoding cell wall remodeling and structural proteins and simultaneously alters the expression of genes associated with cell division and expansion. In addition, a number of Xac-regulated genes are implicated in the synthesis, mobilization and signaling of auxin and gibberellin. Since these hormones control cell division and elongation in several plant species, we examined their ability to modulate the expression of various Xac-regulated cellulases, pectinesterases, glycosyltransferase and expansin genes. Here, we show that all the analyzed genes were rapidly modulated by both exogenously applied NAA (naphthylacetic acid) and gibberellic acid (GA). Significantly, the NAA and GA-mediated regulation of cell wall genes correlated with an up-regulation of genes implicated in the synthesis of GA and auxin signaling, which are also induced in orange leaves upon Xac infection. An inhibitor of GA synthesis significantly decreased transcription of some of the genes up-regulated by NAA, suggesting that a crosstalk between auxin and GA controls the expression of orange genes associated with cell division and expansion triggered by Xac.

Key words: citrus canker, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, cell wall remodeling, auxin, gibberellin

Introduction

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (Xac) is the casual agent of citrus canker, one of the most important diseases of citrus [4, 36]. Xac affects various citrus species and the canker symptoms induced on sweet oranges, lemons and limes are characterized by pustule-like lesions that raise on both surfaces of the leaf and which later become corky and surrounded by a water-soaked margin with a yellow halo. The lesions can also develop on stems and fruits of susceptible plants [36]. How Xac causes canker is still not fully understood, however, canker lesions are thought to be the result of intense cell division (hyperplasia) and expansion (hypertrophy) that occurs in the host tissues after pathogen infection [4].

In a previous study, we have identified numerous sweet orange genes with altered expression upon Xac infection [8]. In particular, we found that Xac strongly up-regulates genes encoding cell wall remodeling enzymes and proteins associated with cell wall elongation, including beta-1,3 (B1.3G) and beta-1,4 (B1.4G) endoglucanases, acidic (AC) and basic (BC) cellulases, pectinesterases (PE), pectinacetylerases (PAE), xyloglucan galactosyltransferases (XGT) and expansins (EXP) [8].

The genes encoding the endoglucanases B1.3G (**CAA03908**) and B1.4G (**CV886058**), and the cellulases AC (**AAB65155**) and BC (**AAB65156**), were strongly induced in orange leaves between 6 and 48 h after Xac infiltration [8]. Members of these conserved category of plant cell wall remodeling enzymes have been shown to be expressed in tissues undergoing rapid expansion [3], during fruit softening [32, 38] and in response to *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* infection [20]. Interestingly, the citrus B1.4G and BC are highly similar to endoglucanases up-regulated in tobacco roots in response to nematode infection, and which were required for cell wall dissolution during the development of the hypertrophied giant cells [13].

In addition to the endoglucanases, Xac induced the expression of PE (**CN181845**) and EXP (**DN621554**) genes [8]. Significantly, the citrus EXP gene is similar to expansins expressed during rice internode elongation and vascular tissue differentiation and which are thought to disrupt non-covalent hydrogen bonds between cellulose microfibrils and xyloglucans [9, 14, 18, 24]. On the other hand, Xac-infected leaves showed a reduction in the expression of two genes related to PAE (**CX675128**) and XGT (**CX076275**) [8]. Notably, the citrus XGT gene is homologous to MUR3, a xyloglucan galactosyltransferase

from *Arabidopsis* required for the addition of a galactosyl unit to xyloglucan [25], the major cross-linking component of cellulose microfibrils.

The changes in the transcriptional profile of cell wall remodeling genes induced by Xac in citrus leaves correlated with an intense up-regulation of genes associated with vesicle trafficking, cell division, growth and differentiation, also triggered by Xac infection. Moreover, Xac significantly changed the transcription of orange genes involved in GA biosynthesis and auxin signaling [8]. Since auxin and GA are known to control cell division and elongation in several plant species, and have been shown to modulate the expression of a number of cell wall remodeling enzymes (9, 17, 22, 34, 41], we hypothesized that, in citrus leaves, they might play a role in the transcriptional control of cell wall modifying genes up-regulated by Xac [8].

In this study, we examined the effect of exogenously applied auxin and GA on the transcriptional regulation of various sweet orange genes implicated in cell wall remodeling, GA synthesis, auxin transport and signaling.

Results and Discussion

NAA and GA₃ modulate transcription of Xac-induced cell wall remodeling genes

To examine whether the cell wall remodeling genes induced by Xac were regulated by auxin and GA, sweet orange leaves were infiltrated separately with solutions of NAA and GA₃ and transcription of the cell wall modifying genes were measured within 2 h after hormone application. Interestingly, both NAA and GA₃ altered the expression of cell wall remodeling genes as early as 30 min of hormone treatment (*figure 1*). Notably, B1.4G, AC, BC, PE and EXP genes showed to be up-regulated at 30, 60 and 120 min after NAA application (*figure 1A*). On the other hand, the application of GA₃ induced the expression of B1.4G, AC, B1.3G, PE, XGT and EXP relative to mock-infiltrated leaves (*figure 1B*). In contrast, XGT was predominantly down regulated by NAA after 120 min of treatment (*figure 1 A*). Thus, the results show that the cell wall remodeling genes that are up-regulated in response to Xac infection are modulated by auxin and GA.

The pattern of hormone responsiveness shown in *figure 1* is in agreement with the general observation that both auxin and GA influence positively the expression of endoglucanases, pectinesterases and expansins during cell elongation and growth [6, 7, 9, 11, 17, 22]. Furthermore, it remarkably correlates with the up-regulation of B1.3G, B1.4G, AC, PE and EXP, as well as with the repression of PAE and XGT genes in Xac-infected leaves [8]. Although the regulation of PAE and XGT genes by NAA and GA₃ has not been reported in other plant species, down-regulation of the citrus XGT by Xac, NAA and GA₃ is consistent with the role of its ortholog MUR3 in Arabidopsis. MUR3, which is 86% identical to citrus XGT, is required to maintain the mechanical strength of the primary cell wall during growth via galactosylation of xyloglucans, which promotes the cross-linking of cellulose microfibrils [25, 31]. Therefore, the coordinated down-regulation of XGT and up-regulation of endoglucanases and expansins by Xac could synergistically favor hypertrophy and hyperplasia.

NAA and GA₃ modulate transcription of GA and auxin metabolism and signaling genes

Since NAA and GA₃ were capable of modulating the expression of the cell wall remodeling genes, and a cross-talk between auxin and GA in the processes of cell elongation and organ growth has been clearly demonstrated [2, 23], we examined whether

the exogenous application of NAA and GA₃ in sweet orange leaves would affect the expression of genes implicated in GA synthesis, auxin mobilization and signaling that were also up-regulated in Xac-infected leaves [8].

The citrus genes related to terpene and GA synthesis selected for this study include a terpene cyclase (**DY259652**) similar to *ent*-kaurene synthases (KS) required for the second step of the GA biosynthesis pathway [26, 40], a homolog (**CX044235**) of a E-E- α -farnesene synthase (FS) that can also catalyze the formation of cyclic monoterpenes precursors of gibberellins [27], and an alcohol dehydrogenase (ADH) similar to TDF (**CV705927**), a potato steroid ADH that was shown to affect plant growth and endogenous levels of GA [1]. In addition, we looked at the expression of two citrus cytochrome P450 monooxygenases, CYP1 (**CX296913**) and CYP2 (**DN620712**), and an ATP-binding cassette (ABC) transporter (**CX641504**) implicated in brassinosteroid synthesis and terpene transport, respectively. CYP1 is similar to DDWF1, a brassinosteroid hydroxylase that controls hypocotyls growth in pea plants [21], whereas CYP2 is related to tobacco CYP involved in alkaloid biosynthesis [30, 35]. The citrus ABC transporter is homologous to PDR1, a tobacco transporter induced by pathogens and terpenes and which plays a role in the transport of diterpenes [15, 19, 37].

Among the genes related to auxin transport and signaling that were up-regulated in Xac-infected leaves [8], we selected two genes (**CX676252**, **CX306117**) homologous to KDEL receptor and MDR transporters implicated in the polar flux of auxin [16, 28], an ADP-ribosylation factor (ARF) (**DR908238**) similar to rice ARF1, which controls root development by regulating auxin level [42], and a NAC transcriptional factor (**DN619712**) homologous to NAC members involved in both auxin and GA signal transduction [33, 39].

Figure 2 shows that both NAA and GA₃ significantly increased transcription of the KS, FS, CYP1, CYP2 and ADH genes, whereas transcription of ABC was induced by GA only. Notably, the expression levels of KS, CYP2 and ADH genes increased hundredfolds upon auxin application, relative to controls and GA₃ treatment. The strong up-regulation of the KS gene by NAA suggests that auxin might affect GA synthesis in citrus as it occurs in numerous plant species [12, 29]. The enhanced expression of the citrus ADH gene in response to NAA supports this idea since its homolog in potato (TDF) appears to modulate the endogenous levels of GA [1].

Although treatments with the hormones enhanced transcription of the genes over time, we found a peak of FS expression at 30 and 60 min after GA and auxin application, respectively (*figure 2A-B*), which suggests a type of negative feedback regulation, a common control mechanism of transcriptional regulation of GA biosynthesis genes [5, 29].

When we looked at the expression levels of auxin transport and signaling genes in response to NAA and GA₃, we observed an up-regulation of the KDEL, MDR and ARF genes in response to NAA (*figure 3A*). Although GA₃ had no effect on transcription of the auxin transport genes (*figure 3B*). This is consistent with the recent findings showing that gibberellin stimulates polar transport of auxin in *Populus* [2]. On the other hand, both NAA and GA₃ appreciably down-regulated the citrus NAC gene within 2h after hormone application (*figure 3*), which apparently is in contrast with its up-regulation by Xac at 48 h post-infection [8]. Nevertheless, it is interesting to note that the citrus NAC gene is similar to a NAC from barley that interacts with the SPY factor, a negative regulator of GA responses [33].

An inhibitor of GA synthesis reduced NAA-induced gene expression but not canker lesions

To investigate whether auxin stimulates GA synthesis in citrus, we applied the inhibitor of GA biosynthesis chlorocholine chloride (CCC) in combination with NAA and measured the transcription of the cell wall remodeling (B1.4G, AC, BC, PE and EXP) and GA synthesis (KS, CYP2 and ADH) genes that were most responsive to NAA. Interestingly, treatments with CCC significantly attenuated the NAA-dependent up-regulation of most genes tested, strongly supporting the idea that the transcriptional regulation of cell wall remodeling and GA synthesis genes by NAA is in part mediated by the *de novo* synthesis of GA (*figure 4A*).

We next examined whether the application of NAA and GA alone or in combination would mimic canker lesions or promote cell growth in orange leaves (fully developed leaves). Nonetheless, we observed no changes in the general morphology of the leaves that had been infiltrated with the hormones, compared to mock controls (not shown). In addition, application of CCC or triiodobenzoic acid (TIBA), an inhibitor of auxin transport, had no visible effect on the development of canker lesions caused by Xac (*figure 4B*), indicating that auxin and GA signaling are not sufficient to promote cell growth in developed citrus leaves and that other factors are required for the coordinated gene

expression that leads to cell division and elongation during canker development [8].

In conclusion, the results presented here show that several genes induced by Xac in citrus leaves appear to be regulated by the common action of auxin and GA. Although the production of auxins by Xac has been reported [10], our observation that Xac increases transcription of auxin mobilization and transport genes [8] indicates that auxin from the host is mobilized during the early stages of infection, which in association with GA would trigger transcription of target genes required for cell division and elongation.

Material and Methods

Plant material and treatments with plant growth regulators and inhibitors

Six-month-old plants of sweet orange (*Citrus sinensis*) “Pêra” cultivar was obtained from certified nurseries and kept in growth room at 25-28°C under 14h/day fluorescent light. Plant leaves were infiltrated with solutions of 5 µM naphthylacetic acid (NAA) and 10 µM gibberellic acid (GA₃) alone or in combination with the inhibitor of GA synthesis chlorocholine chloride (CCC) at 10 µM. Sweet orange leaves were pre-infiltrated separately with solutions of CCC and TIBA at 0.1 and 1.0 mM concentrations in 0.5% DMSO, or 0.5% DMSO as control. After 24 h, the same leaf sectors were infiltrated with an aqueous suspension of Xac (OD_{600nm}= 0.5) and the appearance of canker lesions were monitored daily. CCC and TIBA had no effect on Xac’s growth in culture media (not shown).

Plant mRNA purification

Total RNA was extracted from sweet orange leaves at different time intervals after water or hormone treatments using Trizol (Invitrogen), followed by mRNA purification with FastTrack 2.0 (Invitrogen). The quality and quantity of the mRNA samples were verified by agarose gel and UV spectroscopy.

Quantitative PCR analysis

Primers for qPCR were designed using the Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems). cDNAs generated from water or hormone-infiltrated leaves were diluted and tested to probe the efficiency of the amplifications between targets and endogen controls. Two endogen controls were used (CK937155-hypothetical protein and AAR89627-elongation factor). Three qPCR reactions were performed on each mRNA sample using the SYBR-green mix and the universal conditions of amplification provided by the 7500 System (Applied Biosystems). The results were analyzed by the 7500 System software (Applied Biosystems) using the relative quantification mode.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants 98/14138-2, 00/10266-8 and 03/08316-5). R.A.C. and C.E.B. received fellowships from FAPESP and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), respectively.

References

- [1] Bachem C.W., Horvath B., Trindade L., Claassens M., Davelaar E., Jordi W., Visser R.G., A potato tuber-expressed mRNA with homology to steroid dehydrogenases affects gibberellin levels and plant development, *Plant J.* 25 (2001) 595-604.
- [2] Björklund S., Antti H., Uddestrand I., Moritz T., Sundberg B., Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin, *Plant J.* 52 (2007) 499-511.
- [3] Brummell D.A., Catala C., Lashbrook C.C., Bennett A.B., A membrane-anchored E-type endo-1,4-beta-glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4794-4799.
- [4] Brunings A.M., Gabriel D.W., *Xanthomonas citri*: breaking the surface, *Mol. Plant Pathol.* 4 (2003) 141-157.
- [5] Carrera E., Jackson S.D., Prat S., Feedback control and diurnal regulation of gibberellin 20-oxidase transcript levels in potato, *Plant Physiol.* 119 (1999) 765-774.
- [6] Castillejo C., de la Fuente J.I., Iannetta P., Botella M.A., Valpuesta V., Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform, *J. Exp. Bot.* 55 (2004) 909-918.
- [7] Catala C., Rose J.K., Bennett A.B., Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-beta-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls, *Plant J.* 12 (1997) 417-426.
- [8] 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*, *Mol. Plant Pathol.* (2008) accepted.
- [9] Cho H.T., Kende H., Expression of expansin genes is correlated with growth in deepwater rice, *Plant Cell* 9 (1997) 1661-1671.

- [10] Costacurta A., Mazzafera P., Rosato Y.B., Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is increased in the presence of plant leaf extracts, FEMS Microbiol. 159 (1998) 215-220.
- [11] Derbyshire P., McCann M.C., Roberts K., Restricted cell elongation in Arabidopsis hypocotyls is associated with a reduced average pectin esterification level, BMC Plant Biol. 7 (2007) 31.
- [12] Frigerio M., Alabadi D., Perez-Gomez J., Garcia-Carcel L., Phillips A.L., Hedden P., Blazquez M.A., Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis, Plant Physiol. 142 (2006) 553-563.
- [13] Goellner M., Wang X., Davis E.L., Endo-beta-1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions, Plant Cell 13 (2001) 2241-2255.
- [14] Gray-Mitsumune M., Mellerowicz E.J., Abe H., Schrader J., Winzell A., Sterky F., Blomqvist K., McQueen-Mason S., Teeri T.T., Sundberg B., Expansins abundant in secondary xylem belong to subgroup A of the alpha-expansin gene family, Plant Physiol. 135 (2004) 1552-1564.
- [15] Grec S., Vanham D., de Ribaucourt J.C., Purnelle B., Boutry M., Identification of regulatory sequence elements within the transcription promoter region of NpABC1, a gene encoding a plant ABC transporter induced by diterpenes, Plant J. 35 (2003) 237-250.
- [16] Hesse T., Feldwisch J., Balshusemann D., Bauw G., Puype M., Vandekerckhove J., Lobler M., Klambt D., Schell J., Palme K., Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin, EMBO J. 8 (1989) 2453-61.
- [17] Hutchison K.W., Singer P.B., McInnis S., Diaz-Sala C., Greenwood M.S., Expansins are conserved in conifers and expressed in hypocotyls in response to exogenous auxin, Plant Physiol. 120 (1999) 827-832.
- [18] Im K.H., Cosgrove D.J., Jones A.M., Subcellular localization of expansin mRNA in xylem cells, Plant Physiol. 123 (2000) 463-470.
- [19] Jasinski M., Stukkens Y., Degand H., Purnelle B., Marchand-Brynaert J., Boutry M., A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion, Plant Cell 13 (2001) 1095-1107.

- [20] Jung H.W., Hwang B.K., Pepper gene encoding a basic beta-1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethephon or methyl jasmonate treatment, *Plant Sci.* 159 (2000) 97-106.
- [21] Kang J.G., Yun J., Kim D.H., Chung K.S., Fujioka S., Kim J.I., Dae H.W., Yoshida S., Takatsuto S., Song P.S., Park C.M., Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth, *Cell* 105 (2001) 625-636.
- [22] Kotake T., Nakagawa N., Takeda K., Sakurai N., Auxin-induced elongation growth and expressions of cell wall-bound exo- and endo-beta-glucanases in barley coleoptiles, *Plant Cell Physiol.* 41 (2000) 1272-1278.
- [23] Kurepin L.V., Emery R.J., Pharis R.P., Reid D.M., The interaction of light quality and irradiance with gibberellins, cytokinins and auxin in regulating growth of *Helianthus annuus* hypocotyls, *Plant Cell Environ.* 30 (2007) 147-155.
- [24] McQueen-Mason S.J., Cosgrove D.J., Expansin mode of action on cell walls. Analysis of wall hydrolysis, stress relaxation, and binding, *Plant Physiol.* 107 (1995) 87-100.
- [25] Madson M., Dunand C., Li X., Verma R., Vanzin G.F., Caplan J., Shoue D.A., Carpita N.C., Reiter W.D., The MUR3 gene of *Arabidopsis* encodes a xyloglucan galactosyltransferase that is evolutionarily related to animal exostosins, *Plant Cell* 15 (2003) 1662-1670.
- [26] Margis-Pinheiro M., Zhou X.R., Zhu Q.H., Dennis E.S., Upadhyaya N.M., Isolation and characterization of a Ds-tagged rice (*Oryza sativa* L.) GA-responsive dwarf mutant defective in an early step of the gibberellin biosynthesis pathway, *Plant Cell Rep.* 23 (2005) 819-833.
- [27] Mercke P., Kappers I.F., Verstappen F.W., Vorst O., Dicke M., Bouwmeester H.J., Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants, *Plant Physiol.* 135 (2004) 2012-2024.
- [28] Multani D.S., Briggs S.P., Chamberlin M.A., Blakeslee J.J., Murphy A.S., Johal G.S., Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize br2 and sorghum dw3 mutants, *Science* 302 (2003) 81-84.
- [29] Olszewski N., Sun T.P., Gubler F., Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways, *Plant Cell* 14 (2002) Suppl:S61-80

- [30] Pauli H.H., Kutchan T.M., Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis, *Plant J.* 13 (1998) 793-801.
- [31] Peña M.J., Ryden P., Madson M., Smith A.C., Carpita N.C., The galactose residues of xyloglucan are essential to maintain mechanical strength of the primary cell walls in *Arabidopsis* during growth, *Plant Physiol.* 134 (2004) 443-451.
- [32] Real M.D., Company P., Garcia-Agustin P., Bennett A.B., Gonzalez-Bosch C., Characterization of tomato endo-beta-1,4-glucanase Cel1 protein in fruit during ripening and after fungal infection, *Planta* 220 (2004) 80-86.
- [33] Robertson M., Two transcription factors are negative regulators of gibberellin response in the HvSPY-signaling pathway in barley aleurone, *Plant Physiol.* 136 (2004) 2747-2761.
- [34] Sánchez M.A., Mateos I., Labrador E., Dopico B., Brassinolides and IAA induce the transcription of four alpha-expansin genes related to development in *Cicer arietinum*, *Plant Physiol. Biochem.* 42 (2004) 709-716.
- [35] Siminszky B., Gavilano L., Bowen S.W., Dewey R.E., Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 14919-14924.
- [36] Shubert T.S., Rizvi S.A., Sun X., Gottwald T.R., Graham J.H., Dixon W.N., Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida again, *Plant Disease* 85 (2003) 340-356.
- [37] Stukkens Y., Bultreys A., Grec S., Trombik T., Vanham D., Boutry M., NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense, *Plant Physiol.* 139 (2005) 341-352.
- [38] Trainotti L., Spolaore S., Pavanello A., Baldan B., Casadoro G., A novel E-type endo-beta-1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits, *Plant Mol. Biol.* 40 (1999) 323-332.
- [39] Xie Q., Frugis G., Colgan D., Chua N.H., *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development, *Genes Dev.* 14 (2000) 3024-3036.

- [40] Yamaguchi S., Sun T., Kawaide H., Kamiya Y., The GA2 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes *ent*-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis, *Plant Physiol.* 116 (1998) 1271-1278.
- [41] Zhou H.L., He S.J., Cao Y.R., Chen T., Du B.X., Chu C.C., Zhang J.S., Chen S.Y., OsGLU1, a putative membrane-bound endo-1,4-beta-D-glucanase from rice, affects plant internode elongation, *Plant Mol. Biol.* 60 (2006) 137-151.
- [42] Zhuang X., Xu Y., Chong K., Lan L., Xue Y., Xu Z., OsAGAP, an ARF-GAP from rice, regulates root development mediated by auxin in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 28 (2005) 147-156.

Figure legends

Figure 1. Expression levels of citrus cell wall remodeling genes in response to hormones. Sweet orange leaves were infiltrated with 5 μ M NAA (A) or 10 μ M GA₃ (B) and mRNA samples were analyzed by quantitative PCR at different time intervals after hormone application, relative to control (mock-infiltrated leaves). The genes analyzed include the beta-1,3 (B1.3G) and beta-1,4 (B1.4G) endoglucanases, acidic (AC) and basic (BC) cellulases, pectinesterase (PE), pectinacetyltransferase (PAE), xyloglucan galactosyltransferase (XGT) and expansin (EXP).

Figure 2. Expression levels of citrus genes implicated in GA synthesis in response to hormones. Sweet orange leaves were infiltrated with 5 μ M NAA (A) or 10 μ M GA₃ (B) and mRNA samples were analyzed by quantitative PCR at different time intervals after hormone application, relative to control (mock-infiltrated leaves). The genes analyzed are homologous to kaurene synthase (KS), farnesene synthase (FS), cytochrome P450 (CYP1 and CYP2), alcohol dehydrogenase (ADH) and ABC transporter (ABC).

Figure 3. Expression levels of citrus genes related to auxin transport and signaling in response to hormones. Sweet orange leaves were infiltrated with 5 μ M NAA (A) or 10 μ M GA₃ (B) and mRNA samples were analyzed by quantitative PCR at different time intervals after hormone application, relative to control (mock-infiltrated leaves). The genes analyzed are homologous to KDEL and MDR receptors, ADP-ribosylation (ARF) and NAC factors.

Figure 4. A- Effect of CCC in the NAA-induced expression of cell wall remodeling and GA synthesis genes. Sweet orange leaves were infiltrated with NAA (5 μ M) or NAA in combination with CCC (10 μ M) for 60 min, and mRNA samples were analyzed by quantitative PCR, relative to control (mock-infiltrated leaves). The citrus genes analyzed are homologous to KDEL and MDR receptors, ADP-ribosylation (ARF) and NAC factors. **B-** Sweet orange leaves pre-treated with 1 mM CCC or 1 mM TIBA were infiltrated with Xac. Pustules-like lesions were observed 5 days post-inoculation regardless of treatment. Cleared zones correspond to the infiltrated leaf sectors.

Figure 1

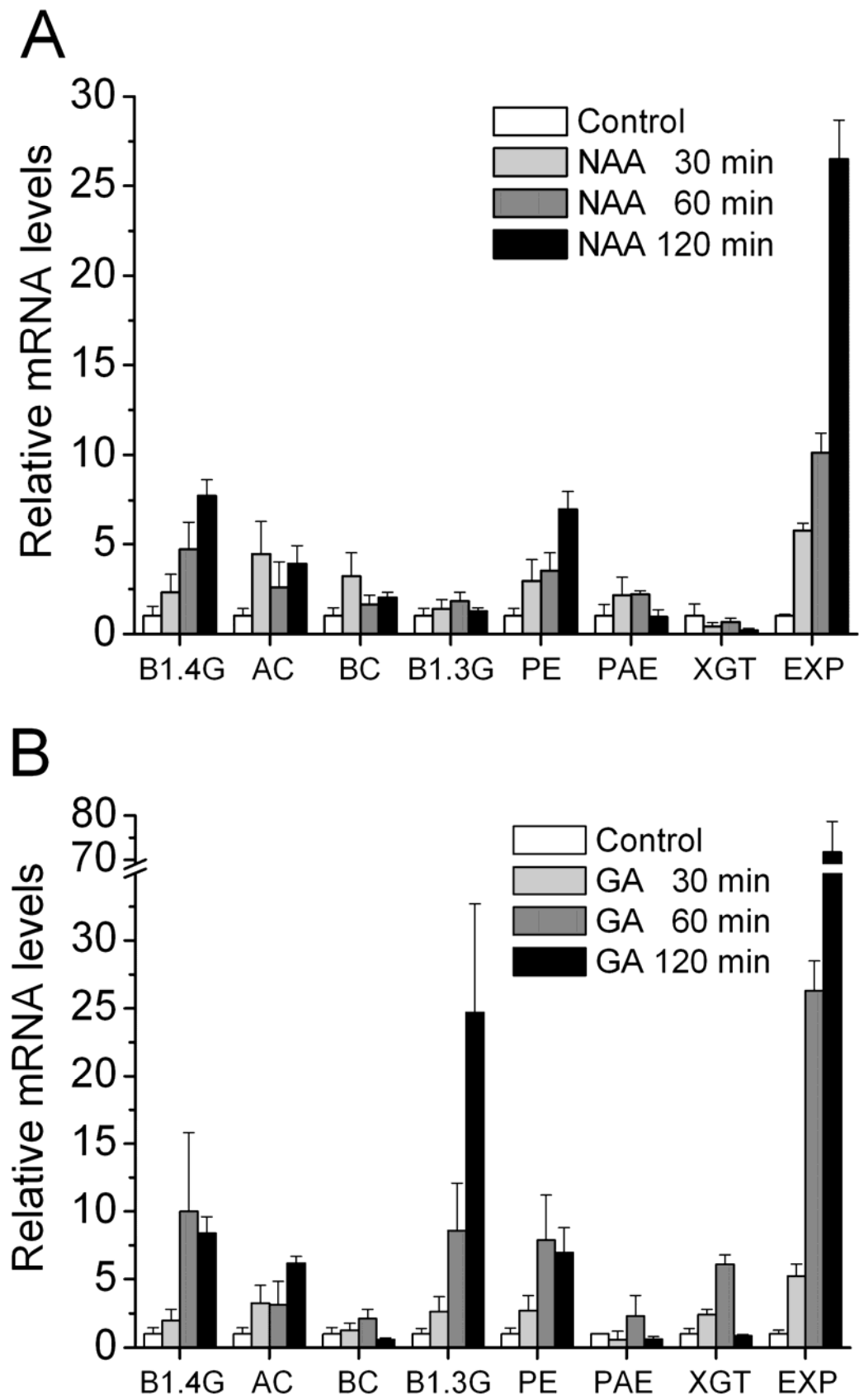


Figure 2

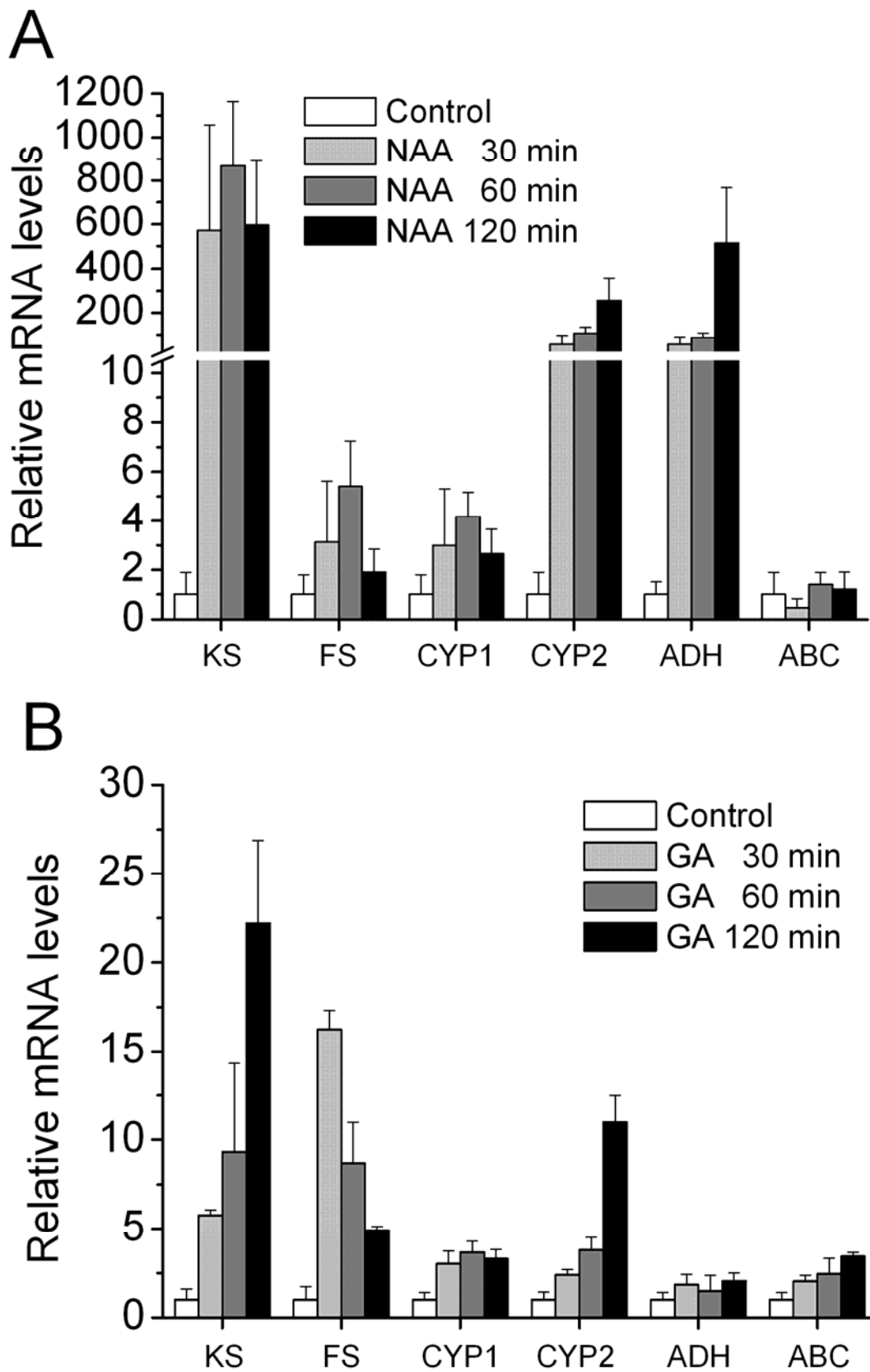


Figure 3

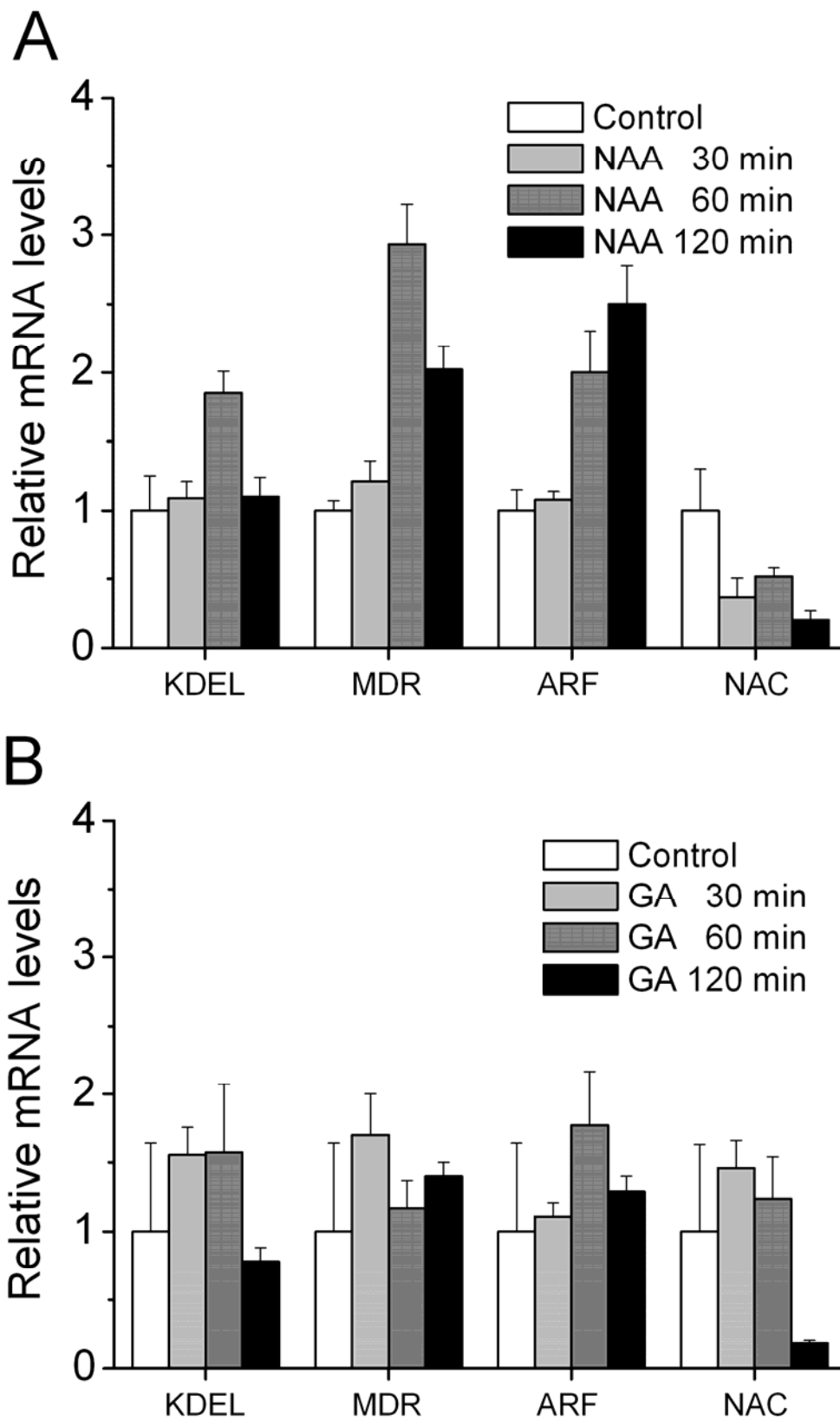
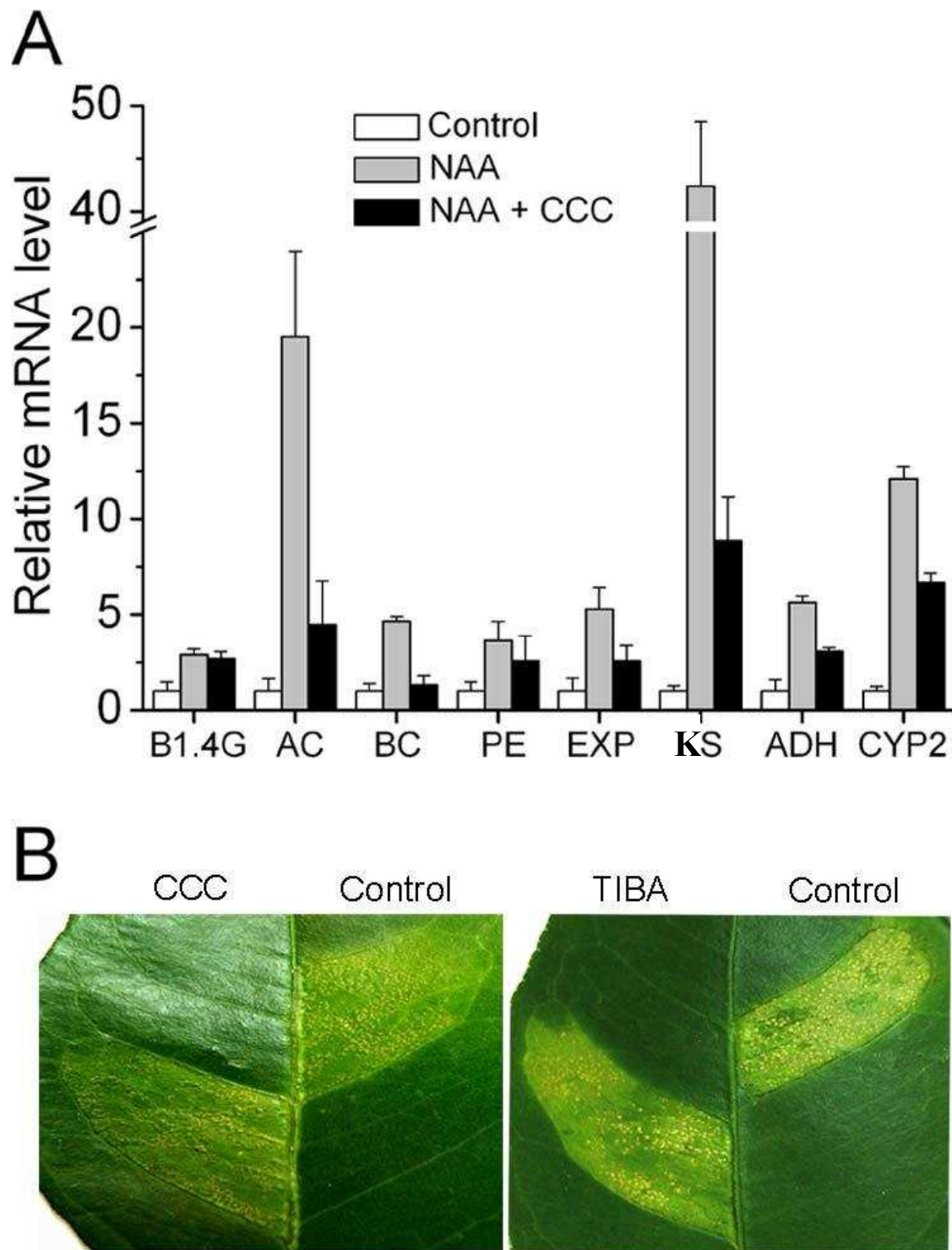


Figure 4



EXPERIMENTOS COMPLEMENTARES DO CAPITULO II.

Tratamento com *1-Naphthaleneacetic Acid* (NAA) e *Gibberellic Acid* (GA₃).

NAA e GA₃ são hormônios vegetais da classe das auxinas e giberelinas, respectivamente. Uma solução aquosa de 5 µM de NAA em 0.1 % de Tween 80 foi utilizada para inocular folhas saudáveis de plantas de laranja através da mesma metodologia descrita anteriormente. Uma vez inoculadas as plantas, coletaram-se as folhas infiltradas em 30, 60 e 120 min após infiltração para extração de RNA. GA₃ 100 µM foi preparado em 0.1 % de Tween 80 e usado da mesma forma que NAA.

Os experimentos com inibidor da síntese de GA₃ (*Chlorocoline Chloride*, CCC) foram realizados inoculando-se simultaneamente o inibidor (10 µM) junto com o indutor.

Genes de remodelamento de parede celular, síntese e sinalização de hormônios são regulados por NAA e GA₃.

Os aspectos mais relevantes a respeito da função dos genes relacionados com o desenvolvimento dos sintomas do cancro cítrico são discutidos no artigo que compõe este capítulo. Os genes de remodelamento de parede celular e de síntese e sinalização dos hormônios auxina e giberelina controlam crescimento, expansão e diferenciação celular. A esse respeito, testou-se a regulação de vários desses genes em resposta à auxina (NAA) e ácido giberélico (GA₃). Verificou-se que a maioria dos genes de remodelamento de parede celular são induzidos em resposta à auxina e giberelina rapidamente após a administração dos hormônios (Cernadas and Bendetti, 2008b). Em particular, expansina, celulase e pectinoesterase são os genes com maior variação na expressão em resposta aos hormônios, o que demonstra o envolvimento direto da auxina e giberelina na regulação dessa classe de genes.

Embora NAA e GA₃ não induziram hipertrofia e hiperplasia quando infiltrados em folhas de laranja, parece provável que auxina e ácido giberélico participem desses processos durante a infecção por Xac. É interessante notar que o gene da *xiloglicanagalactosil transferase* (XGT), que está reprimido durante a infecção com *Xanthomonas*, é também reprimido em resposta a NAA e GA₃ após 2 h de tratamento, o que é consistente com a hipótese dos hormônios mediar respostas de hipertrofia e hiperplasia induzidas por Xac.

O manuscrito mostra que genes envolvidos na síntese de terpenos e giberelinas são também modulados por NAA e GA₃ rapidamente após o tratamento com os hormônios.

Embora GA₃ tenha estimulado positivamente a expressão da maioria dos genes de síntese de terpenos, NAA induziu uma forte expressão do gene *terpeno sintase* (KS), principal enzima da via de síntese de terpenos, do *citocromo P450 (S)-N-metilcoclaurina 3'-hidroxilase* (CYP2) e da *álcool desidrogenase* (ADH). Por outro lado, genes da via de sinalização e transporte de auxina não sofreram mudanças significativas nos níveis de expressão em resposta aos hormônios. Exceto, porém, o gene NAC, um fator de transcrição mediador de respostas de auxina/giberelina, que foi regulado negativamente por ambos GA₃ e NAA. Além disso, verificou-se que os genes MDR (*multidrug resistance protein*) e ARF (*ADP-ribosylation factor*) foram induzidos unicamente por auxina.

O fato da maioria dos genes relatados acima serem modulados por NAA e GA₃ é uma forte evidência de que eles podem estar realmente sob regulação desses hormônios durante o processo de infecção por Xac. Uma vez que GA₃ não alterou significativamente os níveis de expressão dos genes associados à sinalização de auxina, e esta, por sua vez, aumentou em mais de mil vezes a expressão da TS, é sugerido que auxina (NAA) seja um sinalizador da síntese *de novo* de GA₃, que então promove a expressão dos demais genes da via dos terpenóides. Consistente com essa idéia, a regulação aumentada da síntese de GA₃ por auxina foi recentemente relatada para *Arabidopsis thaliana* (Frigerio et al., 2006).

Para testar essa hipótese, avaliou-se a expressão de genes envolvidos no remodelamento de parede celular e na biosíntese e sinalização de giberelina em presença do inibidor de biosíntese de GA₃, *Chlorocoline Chloride* (CCC). Observou-se que CCC reduz a expressão de genes para biosíntese de GA₃, TS, ADH e CYP2 em presença de NAA. Da mesma forma, a expressão dos genes de remodelamento de parede celular, AC e BC, em resposta à auxina, também foi diminuída na presença de CCC. A partir desses resultados especula-se que NAA estimule a síntese *de novo* de GA₃. Como consequência do acúmulo de GA₃, ocorre a indução de genes de remodelamento da parede celular e biosíntese de giberelina. Apesar da ação inibitória na expressão gênica em citros mediada por CCC, folhas de laranja infiltradas com Xac na presença de CCC em diferentes doses mostraram sintomas de cancro semelhantes a folhas controle sem CCC. Uma vez que não foi possível saber se a síntese de GA₃ foi efetivamente inibida nesses ensaios, nada pode ser concluído em relação à necessidade de GA₃ no desenvolvimento dos sintomas do cancro.

Os dados apresentados acima sugerem que auxina desempenha um papel importante na regulação de genes envolvidos no desenvolvimento do cancro cítrico, e mesmo na

interação não patogênica, citros-Xaa. Portanto, procura-se encontrar evidências de que a via de sinalização de auxina está ativada nas interações citros-Xac ou citros-Xaa.

Micro RNAs (miRNAs) e fatores de transcrição da resposta à auxina.

A via de sinalização de auxina em plantas é complexa e envolve dezenas de fatores regulatórios que se interrelacionam em redes de sinalização envolvendo vários componentes (Badescu e Napier, 2006). Atualmente, a literatura relata que parte da regulação gênica mediada por hormônios em planta é pós-transcricional envolvendo micro RNAs (miRNAs). miRNAs (sequências de 21 a 24 nucleotídeos) são produzidos a partir de RNA de fita simple precursores, de sequência auto-complementar, ou por pequenos RNAs chamados de RNAs de interferência (siRNA) que são gerados a partir de RNAs de fita dupla (Finnegan et al., 2003; Bartel, 2004). Recentemente descobertos em plantas, miRNAs têm a função de neutralizar a expressão de genes através de um sistema semelhante ao do silenciamento gênico ou interferência por RNA (Jones-Rhoades et al., 2006). Nesse sistema, precursores de miRNAs são processados pela proteína Dicer gerando os chamados miRNAs duplex que após processamento interagem com o complexo de silenciamento onde é capaz de formar RNA duplex com o transcrito alvo a ser degradado (Jones-Rhoades et al., 2006). Uma vez que miRNAs de plantas são altamente complementares a seus transcritos alvos, além de conservados, a identificação de miRNAs através de bioinformática é bastante plausível (Jones-Rhoades et al., 2006; Zhang et al., 2006). Neste sentido, utilizaram-se as sequências dos miRNAs relacionados às respostas de auxina e ácido giberélico identificados em *Arabidopsis thaliana* para efetuar buscas em banco de ESTs de citros. Dessa forma, e de acordo com os critérios de identificação de miRNAs descritos por Jones-Rhoades et al. (2006) e Zhang et al. (2006), encontraram-se três potenciais miRNAs de *C. sinensis* que podem estar associados à sinalização de auxina (Figura 14). Porém, nenhum miRNA envolvido em resposta à ácido giberélico foi identificado.

Possível estrutura para Cs-miR164 (EST CK936755.1) - **UGGAGAAGCAGGGCAGUGCA**

dG = -124.80 dH = -1580.50 dS = -4693.54 T_m = 63.6

```

      100      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250
      C      .-U AU-  U      | U  CA      AG      -  UAGAG A      A      C      CAUUAC      -  CACAUAUACU C      AAAUUAAUUAAUCCACACAUUUUGA      ACCAAAUCA A AG
UCUCU UUCUU UA  AUAUU GUG--GCA CAU  GCAUG  AAGGUGU GUG  CA GAUGG GAAG AGGGCAGUG  UAACUCAAC CG  CUA UAACAA      AGAA      AGA GC \
AGAGA AAGAA AU  UAUUG UAU  UGU GUG  UGUGU  UUCCACG CGC  GU CUACC CUUC UCCCGUGUAC  AUUGAGUUG GU  GAU AUUGUU      UCUU      UCU CG C
      A      \  - GAU  U      \  ^  -  UG      G-      G  CA--- A      C      U      UUCUUU      A      ACUGACUC-  -  G-----  -  AA
      640      540      350      340      330      320      310      300      290      280      270      260

```

Possível estrutura para Cs-miR160 (EST CV718261.1) - **UGCCUGGCUCCUGUAUGCCA**

dG = -167.30 dH = -1778.50 dS = -5194.91 T_m = 69.2

```

      360      370      380      390      400      410
      -  C      UC      -  AUU-      C      C      A      UCA      A
      UA CUAUG  UAUAUAUU UAUA  AUGUGC UGGCUCC UGUUUGCCAUUUUGC GAG  AUCGA A
      AU GAUAC  AUUAUAUA AUGU  UAUACG ACCGAGG  GUUUGCGGUAGGUG  CUC  UAGCU C
      U  A      CC      U      ACCU      U      A      C      CGG      A
      480      470      460      450      440      430      420

```

Possível estrutura para Cs-miR167 (EST CX296503.1) - **UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG**

dG = -108.62 dH = -1120.60 dS = -3262.87 T_m = 70.3

```

      100      110      120      130      140
      .-UU      -  G      U      C      AA      ACCUC
      CGUGC ACUA UAGUAG UGAAGCUGCCAG AUGAUCUG  CUUUCUUUG \
      GUACG UGGU GUUAUC ACUUUGACGGUC UACUAGAC  GAAAGGGAU C
      \  --  A      A      C      -  CG      CUCUA
      200      190      180      170      160      150

```

Figura 14. Possíveis miRNAs da via de sinalização de auxina em *C. sinensis* identificados por homologia de sequência e formação de estruturas secundárias, segundo Jones-Rhoades et al. (2006) e Zhang et al. (2006). As sequencias em vermelho referem-se aos miRNAs. A sequência de miRNA160 está presente no transcrito do gene ARF10 de citros.

Além dos miRNAs160 (CV718261.1), 164 (CK936755.1) e 167 (CX296503.1), buscou-se encontrar ESTs de *C. sinensis* que pudessem codificar proteínas DICER, uma vez que elas participam diretamente na formação dos miRNAs. Usando-se as sequências dos quatro tipos de DICER de *Arabidopsis*, encontrou-se um EST (EB686967) que pode corresponder a DICER1 em citros (Figura 15).

```

gi|15223286|ref|NP_171612.1| G DCL1 (DICER-LIKE1); ATP-dependent helicase/ ribonuclease
III gi|34922211|sp|Q9SP32|DICER_ARATH G Endoribonuclease Dicer homolog (CARPEL FACTORY
protein) (SHORT INTEGUMENTS 1 protein) (SUSPENSOR1 protein)
Length=1909 Score = 258 bits (658), Expect = 1e-67 Identities = 129/163 (79%), Positives =
139/163 (85%), Gaps = 11/163 (6%) Frame = -2

Query 538 EGLEYKASRSGNLATVEVYIDGVQVGVAQNPPQKKMAQKLAARNALAVLKEKETAEAKEKG 359
          EGLEYKASRSGN ATVEV+IDGVQVGVAQNPPQKKMAQKLAARNALA LKEKE AE+KEK
Sbjct 1747 EGLEYKASRSGNTATVEVFIDGVQVGVAQNPPQKKMAQKLAARNALAALKEKEIAESKEKH 1806

Query 358 DENGK-----KRKNGTQTTFTRQTLNDICLRNWPMPPLYRCVREGGPAHAKRFTY 212
          NG +KNG Q FTRQTLNDICLR+NWMP YRCV+EGGPAHAKRFT+
Sbjct 1807 INNGNAGEDQGENENGKKNKGHPFTRQTLNDICLRNWPMPSPYRCVKEGGPAHAKRFTF 1866

Query 211 AVRVTNTDKGWTDECVGEPMPSPVKKAKDSAAVLLLELLNKWYS 83
          VRVNT+D+GWTDEC+GEPMPSPVKKAKDSAAVLLLELLNK +S
Sbjct 1867 GVRVNTSDRGWTDECIGEPMPSPVKKAKDSAAVLLLELLNKTF 1909

```

Figura 15. Similaridade de seqüências entre o produto do EST EB686967 de *C. sinensis* (query) e a proteína DICER1 de *Arabidopsis* (Sbjct). Alinhamento feito com o programa BLASTX.

Como a DICER1 é a enzima mais relevante no processamento de miRNAs, analisou-se o padrão de expressão desse EST juntamente com o dos miRNAs 160, 164 e 167 (Figura 16). Notou-se ainda que a seqüência do provável miRNA160 é complementar ao transcrito ARF10 (*auxin-response factor 10*) de *C. sinensis*. Portanto, analisou-se também a expressão do gene ARF10 de citros em resposta à infecção por Xac e Xaa (Figura 16). Observou-se expressão elevada de DICER1, ARF10 e miRNAs em resposta à infecção por ambas *Xanthomonas*. Porém, o transcrito correspondente ao gene ARF10 está diminuído no tratamento com as bactérias, o que é consistente com a hipótese de ARF10 ser alvo do miRNA160. Além disso, a expressão aumentada de DICER1 é também consistente com níveis elevados de precursores de miRNAs. Esses dados reforçam a idéia de que, durante a infecção por Xac e Xaa, a via de sinalização de auxina é modulada. Entretanto, como esta modulação está ocorrendo por ambas Xac e Xaa, a sinalização de resposta à auxina não pode explicar o diferencial de patogenicidade observado entre essas bactérias. Os resultados revelam entretanto, um aspecto interessante em quanto à possível regulação do ARF10 mediada por miRNA160.

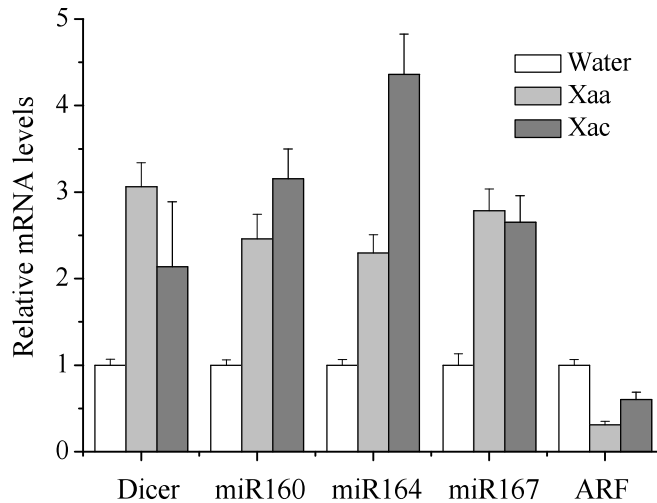


Figura 16. Expressão gênica dos genes DICER1, ARF10 e miRNAs160, 164 e 167 de citros, em resposta à infecção por Xaa ou Xac. Nota-se uma expressão elevada de DICER1, ARF (ARF10) e miRNAs em resposta à infecção por ambas *Xanthomonas*. Porém o transcrito correspondente ao gene ARF10 está diminuído no tratamento com ambas bactérias.

Recentemente, foi demonstrado que ARF10 de *Arabidopsis* é o alvo do miRNA160 e controla a formação de células da ponta da raiz em resposta à auxina. Verificou-se que plantas que superexpressam miRNA160 tem níveis menores de ARF10 e apresentam um descontrole na divisão celular junto com a formação de tumor na ponta da raiz, fenótipo que é semelhante à de plantas *arf10* “knock out” (Wang et al., 2005). Assim como auxina e miRNA160 controlam a expressão de ARF10, indispensável para o controle da divisão celular no desenvolvimento da ponta da raiz em *Arabidopsis*, a expressão elevada de miRNA160 em citros infectado com *Xanthomonas* poderia estar associada ao fenômeno de hipertrofia e hiperplasia induzido por essas bactérias.

CAPITULO III

Isolamento e caracterização de regiões promotoras de genes que são induzidos precocemente durante a infecção com *Xanthomonas*.

O último capítulo desta Tese de Doutorado relata o isolamento de duas regiões promotoras de genes que codificam para proteínas relacionadas com patogenicidade (*PR proteins*) ou proteínas PR.

Genes que codificam para *PR-1* e *PR-5* são fortemente induzidos durante a infecção com *Xanthomonas* em folhas de laranja doce. Além disso, a indução parece ser independente da síntese protéica já que esses genes continuam a ser induzidos por Xac quando co-infiltrada com o inibidor de síntese protéica, cicloheximida.

Notavelmente, existem elementos *cis* reguladores nas regiões promotoras dos genes *PR-1* e *PR-5* de citros semelhantes aos denominados “*upa boxes*”. Esses *upa boxes* foram caracterizados em pimenta como sendo os alvos do efector de virulência AvrBs3. Significativamente, a proteína PthA de Xac, que é 97% idêntica à AvrBs3, também é capaz de ligar-se nesses “*upa boxes*” de *PR-1* e *PR-5* de citros.

INTRODUÇÃO

As proteínas relacionadas com patogenicidade (proteínas PR) formam parte de um grupo heterogêneo de proteínas cujos genes codificantes são rapidamente induzidos por infecções patogênicas, ácido salicílico, ácido jasmonico ou etileno (Seo et al., 2008). Ademais, a expressão gênica de *PRs* é promovida por vários fatores bióticos ou abióticos como, água quente (Pavoncello et al., 2001), radiação UV e machucado (Porat et al., 1999) ou, ácido β -amino butírico (Porat et al., 2003). As proteínas PR se agrupam em 17 famílias, e de acordo com o banco de dados de citros (CitEST), existem EST's de citros para cada uma dessas famílias (<http://citest.centrodecitricultura.br>; Campos et al., 2007).

Mediante análises *in silico* de bibliotecas de citros (CiEST) construídas a partir de diferentes tecidos da planta, Campos e colaboradores (2007) mostraram que não ocorre expressão de *PR-1* ou *PR-4* em frutos de citros, mas sim em raiz. Em contraste, *PR-5* é expresso em vários tecidos como, folhas, frutos, flores ou sementes; no entanto, parece não ser detectado em raiz.

Tanto *PR-1* quanto *PR-5* possuem atividade contra fungos e oomicetes (van Loon et al., 2006). Apesar do mecanismo molecular de ação correspondente de *PR-1* ainda não ter sido estabelecido, várias funções foram relatadas para membros de *PR-5* como, por exemplo: permeabilizadores de membrana, ligadores e hidrólise de glucanos e apoptose (Melchers et al., 1994; Abad et al., 1996; Narasimhan et al., 2001; Osmond et al., 2001; van Loon et al., 2006). Por outro lado, *PR-4* junto com *PR-3*, *PR-8* e *PR-11* foram descritas como endoquitinases capazes de hidrolisar quitina presente na parede celular de fungos.

Foi reportado que plantas de citros transgênicas, expressando níveis elevados do gene *PR-5* de tabaco, apresentaram maior resistência contra o patógeno *Phytophthora citrophthora* (Fagoaga et al., 2001).

No primeiro capítulo desta tese mostrou-se que plantas de laranja doce infectadas com *Xanthomonas* apresentam forte indução de genes que codificam proteínas PR. Inclusive, em experimentos mais recentes realizados em nosso laboratório, notou-se que a indução de proteínas PR ocorre ainda quando o tecido é tratado previamente com o inibidor de síntese protéica, ciclohexemida (Pereira et al., em andamento).

Quatro genes que codificam proteínas PR de citros foram selecionados para o isolamento de promotores, *PR-1*, *PR-4*, *PR-5.1* e *PR-5.2*. Cada um desses genes está representado através do EST correspondente na lâmina de microarranjos de DNA de citros (AFFYMETRIX Citrus GeneChip).

Entre os vários ESTs da família *PR-5* que aparecem induzidos por Xac na lâmina de microarranjos, destacam-se alguns muito similares com a proteína *thaumatin-like* (CAI38795) de abacaxi (*Actinidia deliciosa*) e *osmotin-like* (AAV34889) de cacau (*Theobroma cacao*), com exceção do EST CX676279 que é diferente do anterior na porção 5'. O EST CX676279 codifica uma proteína de laranja similar à proteína *thaumatin-like* (ABV89611.1) de nabo (*Brassica rapa*). Assim, esta análise detectou dois tipos distintos de *PR-5*, cuja diferença aparece na região amino terminal das proteínas. Por este motivo, foram derivados oligos independentes com o intuito de isolar os dois promotores, *PR-5.1* e *PR-5.2*. Os ESTs para *PR-1* e *PR-4* de citros possuem similaridade com a proteína ABC47922 de maçã (*Malus domestica*) e CAA41437 de tabaco (*Nicotiana tabacum*), respectivamente.

MATERIAIS E METODOS

Clonagem de prováveis regiões promotoras de genes induzidos por *Xanthomonas*.

Os EST's de *C. sinensis* correspondentes a *PR-1*, *PR-4*, *PR-5.1* e *PR-5.2*, fortemente induzidos por Xac e Xaa, foram identificados na lâmina de microarranjos de citros. A sequência dos EST's correspondentes de cada PR, foram usadas para derivar oligos para amplificação das respectivas regiões promotoras (Tabela 3).

Tabela 3. Proteínas PR, ESTs e oligos desenhados para o isolamento de promotores.

Proteína PR	EST (BlastN)	Oligos
PR-1	CF653559	PR-1 R1 5'-GCCAACACCAACCTGTGCCC-3' PR-1 R2 5'-CATGGGAAGAGAGAATTAGGG-3'
PR-4	CF836102	PR4-R1 5'-CACATTAGAAGCACTTTGGGC-3' PR4-R2 5'-GACAAAGTGACAGAATCACAC-3'
PR-5.1	CX045582	PR-5.1 R1 5'-GTTTGACCCTTGTCGAGTTGCC-3' PR-5.1 R2 5'-AATTTGGCAGCATGAGTCAGGG-3'
PR-5.2	CF836158 CK935296	PR-5.2 R1 5'-AGCCCAGACCGTGTAGGGGC-3' PR-5.2 R2 5'-CGAAAGTGGCTGCGTTGACCC-3'

Isolamento de DNA genômico de Laranja Pêra e construção de biblioteca genômica.

Três folhas jovens de plantas de laranja foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até pó. O protocolo utilizado para isolamento de DNA estipula o uso do detergente não iônico CTAB (cetil-trimetil-amonia brometo) para quebrar as células e formar complexos solúveis com ácidos nucleicos em presença de altas concentrações de NaCl (Ausubel et al., 1994). Em seguida, o detergente foi removido diminuindo as quantidades de sal e o DNA genômico foi precipitado com isopropanol. O produto precipitado foi lavado três vezes com etanol 75% para eliminar restos de CTAB e sais. O DNA genômico foi resuspendido em água, quantificado através da leitura 260/280 nm num espectrômetro de UV e sua qualidade e pureza foram verificadas em gel de Agarose.

A biblioteca genômica de laranja foi construída visando isolar promotores dos genes induzidos durante a infecção com *Xanthomonas*. Para isto, 5 µg de DNA genômico de laranja foram parcialmente digeridos com 10 U da enzima *Nla*III (CATG) durante meia hora e o produto da digestão foi separado em gel de Agarose 1%. A partir do gel, foram

isolados fragmentos de DNA entre 500 e 1000 pb para serem ligados ao “adaptador A”, que é idêntico ao adaptador 1 desenhado para SSH, com 10 U da enzima T4 DNA ligase. Separadamente, 5 µg DNA genômico foram parcialmente digeridos com a enzima *SphI* (GCATGC) gerando fragmentos de DNA em torno à 2000 e 3000 pb que também foram ligados ao “adaptador A”. A biblioteca de DNA genômico de laranja (*SphI*) que foi utilizada com sucesso possui um tamanho médio de fragmento em torno de 2 kb.

Clonagem de prováveis regiões promotoras.

Para a clonagem das regiões 5' dos ESTs candidatos utilizou-se uma estratégia similar à descrita pelo kit comercial *genome walker* (CLONTECH). Desta forma, as bibliotecas de DNA construídas anteriormente foram usadas como DNA molde numa reação de PCR (PCR primário) que contem a combinação de oligos PR-R1 e Nested A correspondente a cada um dos genes candidatos (Figura 17).

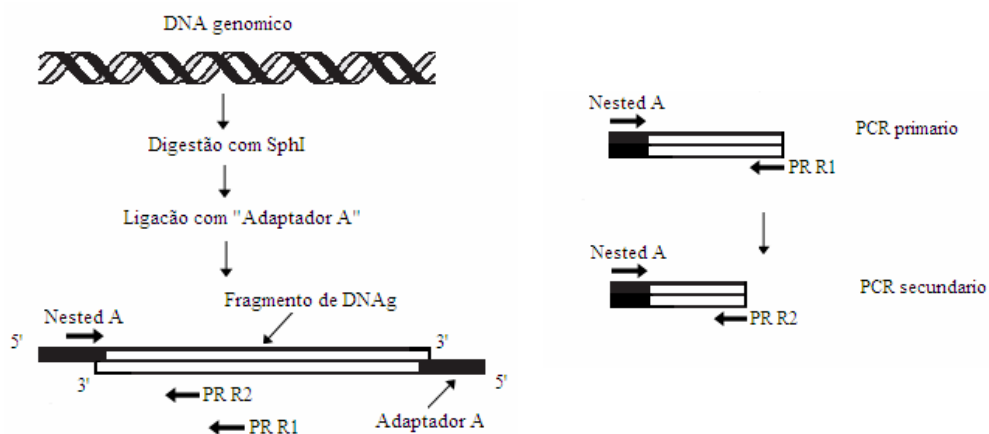


Figura 17. Procedimento levado a cabo para o isolamento das regiões 5' dos genes que codificam para *PR-1*, *PR-4*, *PR-5.1* e *PR-5.2*. Os produtos da digestão do DNA genômico com *SphI* (~2Kb) foram ligados ao Adaptador A. Os PCRs primário e secundário foram realizados com os oligos específicos de cada gene, PR R1 e PR R2, respectivamente.

Para as reações de PCR primário foram utilizadas 2U da enzima *Taq platinum* DNA polimerase (INVITROGEN), 0.2 µM de cada primer (Nested A e PR-R1), 200 µM dNTPs e aproximadamente 10 ng de DNA da biblioteca genômica em 20 µL de reação. O produto do PCR primário foi diluído (200X) e utilizado como molde numa reação de PCR secundário, usando desta vez os oligos PR-R2 e Nested A (Figura 17). As condições de PCR foram: 1 ciclo de 3 min a 95°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 sec, 58°C por 30 sec, 72°C por 2 min. Os produtos de PCR foram separados e purificados em gel de agarose 1% e em seguida clonados no vetor pGEM T (PROMEGA). Os plasmídios recombinantes

foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico e os clones recombinantes, identificados por mapa de restrição, foram seqüenciados.

Com o intuito de melhorar a performance do experimento, foram construídas duas bibliotecas de DNA genômico digerido com *Sph*I (biblioteca I e II). A biblioteca II, difere da I em que, após a ligação dos adaptadores, foi tratada com a enzima TdT *terminal transferase* (INVITROGEN) em presença de 30 μ M de dCTP. A TdT *transferase* incorpora nucleotídeos na extremidade 3'-OH da molécula de DNA de forma independente da fita molde. Esta reação foi utilizada para bloquear a extensão do adaptador A, criando o sítio Nested A, durante o primeiro ciclo de PCR. Desta forma, apenas seriam amplificados exponencialmente produtos a partir dos oligos PR-R2s e Nested A, evitando a amplificação de moléculas de DNA contendo apenas Nested A em ambos extremos.

Análise das prováveis regiões promotoras dos genes PRs.

As regiões 5' de *PR-1* e *PR-5.2* foram analisadas com os programas “PLANTCARE” (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) e “PROSCAN” (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>). Enquanto o “PLANCARE” é uma base de dados que contém promotores de plantas junto com seus elementos reguladores “cis”, o “PROSCAN” prediz regiões promotoras com base em homologia de seqüências alvo da RNA polimerasa II de eucarioto.

Expressão e purificação de proteínas PthA de Xac.

As quatro variantes de PthAs codificados no genoma de Xac (isolado 306) foram isolados por PCR e clonados no vetor de expressão pET28a usando os sítios *Nde*I e *Eco*RI. Os plasmídios recombinantes com cada uma das isoformas foram introduzidos em cepas de *E.coli* BL21 (DE3) para expressão das proteínas recombinantes em fusão com cauda de Histidina que permite a purificação através de cromatografia de metal imobilizado, IMAC (Sambrook et al., 2001).

Para isso, os respectivos clones foram crescidos em meio LB suplementado com 50 mg/mL de canamicina até atingir uma absorbância (600 nm) de aproximadamente 0.6. Nesse momento, as culturas foram induzidas com 0.4 mM de IPTG e após 3h de indução a 28°C as células foram coletadas e lisadas com um sonicador (SONICS-VIBRA CELL) utilizando pulsos de 30 segundos. O extrato celular contendo as proteínas recombinantes foi incubado com uma resina *Talon* de Cobalto (CLONTECH) equilibrada nas mesmas condições que as células lisadas, 50 mM Tris HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 10% Glicerol e

15 mM de Imidazol. A incubação do extrato com a resina foi durante 4 hs em presença de DNase pancreática (500 ng/mL), RNaseA (50 µg/mL) e 2 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂). Após a incubação, a coluna foi lavada com 10 volumes (de coluna) de tampão de equilíbrio e 10 volumes de tampão de equilíbrio adicionado com 15 mM de Imidazol para eliminar inespecificidades. A eluição da coluna se levou a cabo em 2 etapas, a primeira com 5 volumes tampão de equilíbrio contendo 50 mM de Imidazol e a segunda com 5 volumes tampão de equilíbrio contendo 100 mM de Imidazol.

Dicroísmo circular (CD) da proteína PthA4

O espectro de CD da proteína PthA4 de Xac foi gerado através de um espectropolarímetro (JASCO J-810). A faixa de luz utilizada para o experimento foi de 190 a 240 nm. Os espectros foram coletados em cubetas de quartzo com caminho óptico de 0,1 cm (HELMA), contendo amostras da proteína na concentração de 20 µM em tampão Tris-HCl (pH 8.0) 5 mM, KCl 60 mM, EDTA 0.2 mM, MgCl₂ 5 mM e 5% de Glicerol. Em total, de 25 leituras consecutivas foram acumuladas para obter o espectro médio resultante. Os dados foram corrigidos pela contribuição da linha base do tampão. A previsão de estrutura secundária foi obtida mediante a análise dos espectros com o programa CDSSTR (Whitmore and Wallace, 2004 e 2008).

Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética em gel (EMSA).

As diferentes proteínas PthA purificadas foram utilizadas para realizar o experimento de *gel-shift* ou EMSA. Para isso, três sondas específicas para os promotores de *PR-I* e *PR-5.2* foram sintetizadas de acordo com as figuras 23 (A) e 24 (A), respectivamente (Resultados - Capítulo III). Tais sondas (50 pMoles) foram marcadas com [α -P³²]ATP mediante a incorporação do material radiativo utilizando a T4 DNA polimerase. Cada sonda marcada foi purificada em coluna de *ProbeQuant*TM G-50 (GE HEALTHCARE) para eliminar nucleotídeo não incorporado.

Aproximadamente 20 nMoles de proteína purificada foram incubados com cada uma das sondas a temperatura de ambiente durante 30 minutos e em seguida aplicadas num gel de poliacrilamida (6%) não denaturante (Sambrook et al., 2001). A corrida foi feita a 180 volts durante 80 minutos. Os géis foram removidos da cuba electroforética, desidratados e expostos a lâminas de IP para serem logo revelados no equipamento “Phospho-imager”.

Análise da expressão transiente de genes repórteres em folhas de *N. benthamiana*

O gene repórter *uidA* que codifica a enzima β - Glucuronidase (GUS) foi clonado sob controle das regiões promotoras de *PR-1* ou *PR5-2* para realizar experimentos de expressão transitória em plantas de *N. benthamiana*. A construção foi realizada no plasmídio binário pBI121 (CLONTECH) substituindo o promotor CaM35S (*Hind*III e *Bam*HI) com os respectivos promotores de *PR1* ou *PR5.2*. Os clones foram confirmados por seqüenciamento e introduzidos em *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mediante eletroporação.

A construção $\Delta 5'$ PR5-GUS possui uma inserção randômica proveniente da subclonagem previa no vetor pGEM T (PROMEGA). Dita seqüência corresponde a uma parte do “polilinker” desse vetor e ocorre enseguida ao TATA box do promotor *PR-5.2*.

Os genes *pthAs* foram subclonados a partir do vetor pet28a no pBI121 usando os sítios *Xba*I e *Xho*I. Para tanto, usou-se o adaptador *Xho*I-*Sac*I (5'-tcgaagct-3') que permite a ligação da extremidade *Xho*I (inserto) com a *Sac*I (plasmídio).

Cepas de LBA4404 levando as diferentes construções foram crescidas em meio YEP líquido (Sambrook et al., 2001) com agitação durante 24 hs a 28 °C. As bactérias foram coletadas mediante centrifugação e ressuspensas num tampão 10 mM MÊS (pH 5,8) acrescentado com 10 mM de MgCL₂ e 500 µg/mL de Acetosiringona. A suspensão das bactérias foi infiltrada em folhas de *N. benthamiana*. As folhas foram coletadas 72 h após a inoculação para realizar o ensaio histoquímico de detecção de gene repórter com o reagente X-gluc (Jefferson, 1987).

Para os ensaios de co-infiltração, cepas de LBA4404 transformadas com pBI121-*pthA* ou pBI121-*PR-5.2GUS* foram crescidas separadamente, coletadas e ressuspensas no tampão descrito acima. As suspensões contendo as bactérias (aproximadamente 0.2 de absorbância) foram juntadas para formar um único inoculo que foi infiltrado em folhas de *N. benthamiana*.

RESULTADOS

Clonagem de prováveis regiões promotoras.

Entre os quatro genes selecionados para a busca de promotores, apenas três regiões 5' correspondentes à *PR-4*, *PR-1* (~550pb) e *PR5.2* (~450pb), foram identificadas (Figura 18).

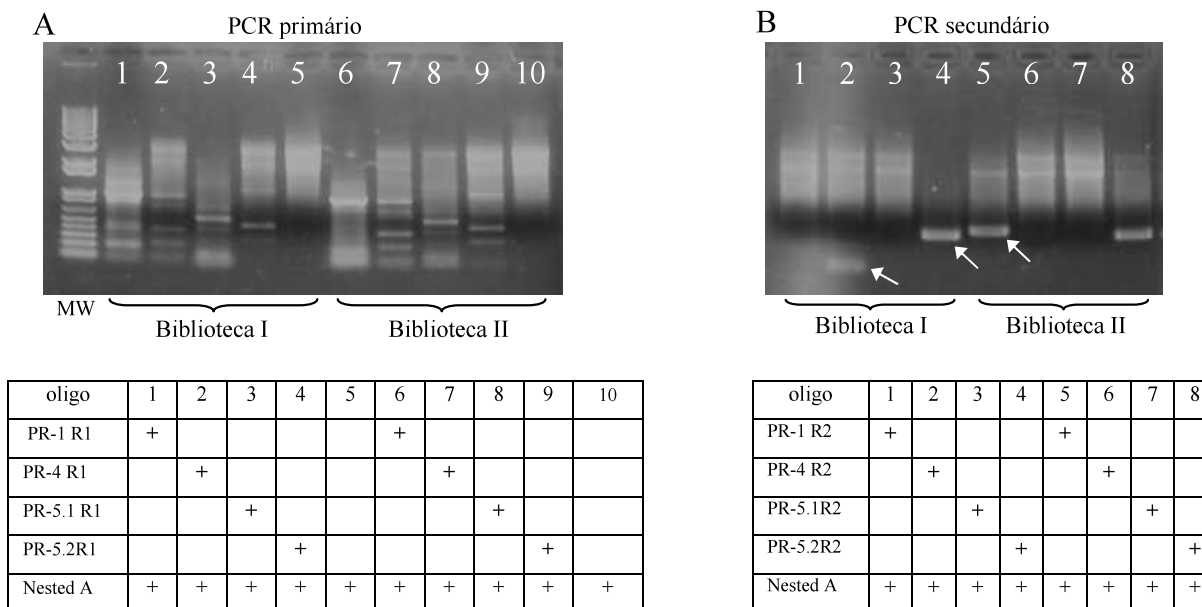


Figura 18. A) Produto do PCR primário separado em gel de agarose 1%. Foram utilizadas duas bibliotecas como “template” (Biblioteca I e II). B) PCR secundário aplicado em gel de agarose 1%, três bandas (indicadas pelas setas) foram clonadas. As tabelas indicam os oligos usados em cada reação.

O clone PR-4 foi descartado por não ter adaptador ligado além de ser um produto de PCR demasiado pequeno (~100 pb). Os clones que aparecem na caneleta 4 e 8 (PCR secundário) foram seqüenciados resultando serem idênticos e corresponderem à região 5' do gene *PR-5.2*. Após o seqüenciamento dos fragmentos, também verificou-se que o clone da caneleta 5 (Figura 18-B) corresponde à porção 5' de *PR-1*, através de alinhamento com base de dados de ESTs.

Análise das prováveis regiões promotoras dos genes PRs.

A Figura 19 apresenta o resultado da análise da região 5' do clone *PR-5.2* com os dois programas, PLANTCARE e PROSCAN. O PROSCAN prediz um provável “TATA box” e o início de transcrição. Por outro lado, o PLANTCARE foi capaz de detectar outros tipos de elementos “cis” como, por exemplo, “ATCT-motif” envolvidos na resposta à luz, “CAAT box” que são regiões “enhancers” comumente encontradas em promotores, “TATA

box”, “HSE” resposta a estresse por calor, “TGACG-motif” resposta a jasmonato e “W box” em resposta a ferimento e patógenos (Figura 19). O “W box” é reconhecido por fatores de transcrição do tipo WRKY.

CATGCATTCATTCTAGTGAAATTTTCTATATCTTAATCTTAATTGCTAAGTTAAAATAACCCACATAAGCTTCCAACGAGG
GTGATTTAAGTCAACACCACGAGAATTATTAATTAG**TGACG**ACGGACAACCACCGACGGCAATGCTACATATTAATACTAA
ATAATTA**AAATAAATTT**CACATATAGAATCGGTCTCATATATTTGCTAGCTACATTT**CTTGACCA**ATCTTCATATGGTGCCA
AACACCACCACATCAACTCTCAAAAATGTCTACAATACT**AATCCAATCT**AACAGTACACATTCTAAAATTT**TATATAA**ACCC
TCATCCATTTCCCCTCCAAACATAGCCAAA**ATGA**ACTACTTTGTATCTTTATTAAATGCATCCTTCCTTTTCTCACCCCTG
TACTTAACCTTGGGTC**CAACGCAGCCACTTTCG**

Figura 19. Sequência da região 5’ não codificante de *PR-5.2* (5’*PR5.2*). Em negrito aparecem os sítios: ATCT-motif, CAAT box, HSE, TGACG-motif, W box, TATA box e o provável ATG do início de tradução. A porção sublinhada corresponde ao início de transcrição predito. Em azul, a sequência do oligo *PR-5.2 R2*.

Curiosamente, tanto 5’*PR-1* quanto 5’*PR-5.2* possuem uma sequência consenso chamada de TGA box (TGACG) que é o alvo do fator de transcrição TGA e que foi detectada por PLANTCARE mas não por PROSCAN. Esta região esta envolvida na indução transcricional de *PR-1* de *Arabidopsis* em resposta ao estado redox da célula que pode ser manipulado por ácido Salicílico (Pieterse and Van Loon, 2004).

As sequências 5’ de *PR-5.2* e *PR-1* possuem uma região consenso similar ao “*upa* box” de pimenta.

Surpreendentemente, os clones 5’*PR-5.2* e 5’*PR-1* contém uma região muito similar ao “*upa* box” presente nos genes *upa20* e *Bs3* de pimenta (Römer et al., 2007; Kay et al., 2007). Além disso, o promotor do gene *Bs3* possui um consenso “ACCATCC” que também está presente no 5’*PR-1* e que se encontra próximo ao provável TATA box, “TATAAA” (Figura 20).

Bs3 5’ CCAATTTTATTTATATAAACC-TAACCATCCTC-3’
Upa20 5’ TTTCTATCTCTCTCTTCATCTTTATATAAACC-TGACCCCTTGTGACATTCTGAG **UpaBox**
PR5.2 5’ CTAACAGTACACATTTCTAAAATTTATATAAACCCTCATCCATTTCCCCTCCAAACA
PR1 5’ AATTTTCTTCCAACCGTTATCTCTATAAATACCAGTCGTACCATCCCATTTT

Figura 20. *upa* box descrito para os genes *Bs3* e *Upa20* de pimentão. Alinhamento com os clones 5’*PR-1* e 5’*PR-5.2* de laranja isolados neste trabalho. Sublinhado aparece uma região de consenso entre *Bs3* e *PR-1*.

Como fora descrito na introdução geral desta tese, AvrBs3 liga-se ao *upa* box e atua como um fator de transcrição induzindo a transcrição de *upa20* ou *Bs3*. Em pimenta, a indução transcricional de *upa20* ou *Bs3* causa alongamento celular (susceptibilidade) ou HR, respectivamente. PthA é 97% idêntico com AvrBs3 e, portanto, especula-se que funcione de modo similar reconhecendo regiões de tipo *upa* box em promotores de citros. Para testar esta possibilidade, foram realizados experimentos de retardo de mobilidade

eletroforética em gel (EMSA - *Electrophoretic Mobility Shift Assays*) usando as proteínas PthA1, 2, 3 e 4.

Expressão e purificação de proteínas PthA de Xac.

As quatro variantes de PthAs de Xac foram purificadas com sucesso mediante cromatografia de metal imobilizado (IMAC). Os resultados mostram que ainda uma fração considerável da proteína é retida na resina de Cobalto (Caneletas 8 - Figura 21). Entretanto, as frações eluídas da coluna (Caneletas 6 – Figura 21) contém quantidade suficiente para realizar experimentos posteriores, dicroísmo circular e EMSA. A proteína PthA4 foi purificada em maior concentração respeito das outras variantes, a quantidade de proteína purificada foi de aproximadamente 0,3 mg/ml.

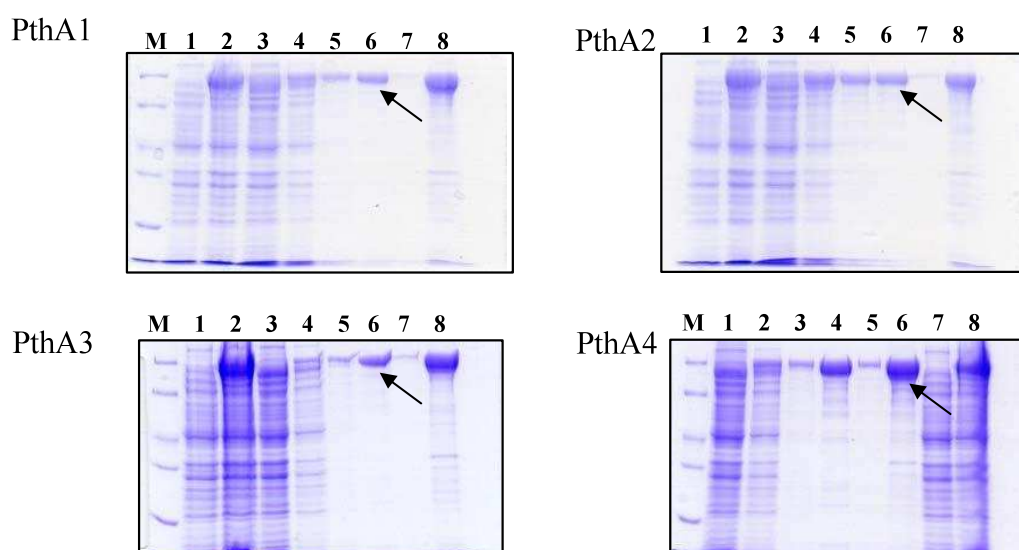


Figura 21. Gel de poliacrilamida 12 % (PAGE - SDS) mostrando a purificação das isoformas de PthA presentes em Xac. M: marcador de peso molecular; 1 e 2: não induzido e induzido (0.4 mM de IPTG); 3: *flow-through*; 4 e 5: primeira lavagem; 6 e 7: segunda lavagem; 8: resina remanescente. As setas indicam as frações utilizadas para os experimentos de *gel shift*.

Dicroísmo circular de PthA4.

A Figura 22 mostra o espectro de dicroísmo circular da proteína PthA4. O espectro prediz: 12 % de α -helice, 30 % de laminas- β e 35% desordenado. Estes resultados não estão de acordo com outra predição anterior que sugere que AvrBs3 deve estar composto principalmente por α -helices (Schornack et al., 2006).

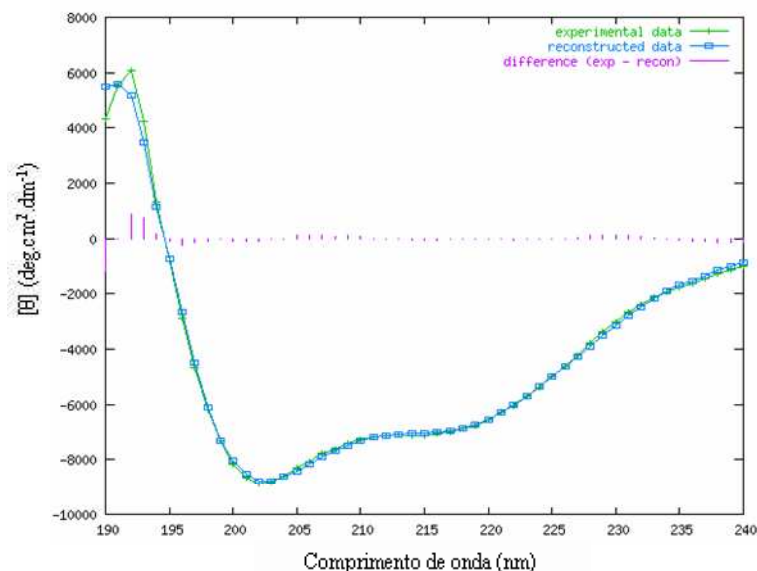


Figura 22. Espectro experimental de dicroísmo circular com 20 μM de PthA4 recombinante realizado a 20°C. O espectro experimental (em verde) é comparado com o espectro de referência (azul).

Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética em gel (EMSA).

Os experimentos de EMSA mostraram que as diferentes variantes de PthAs são proteínas capazes de ligar DNA inespecificamente. No entanto, o PthA4, que é análogo estrutural de AvrBs3, e o PthA1 em menor medida, parecem ligar preferencialmente na região *upa box* dos genes *PR-1* e *PR-5.2* (Figura 23 e 24).

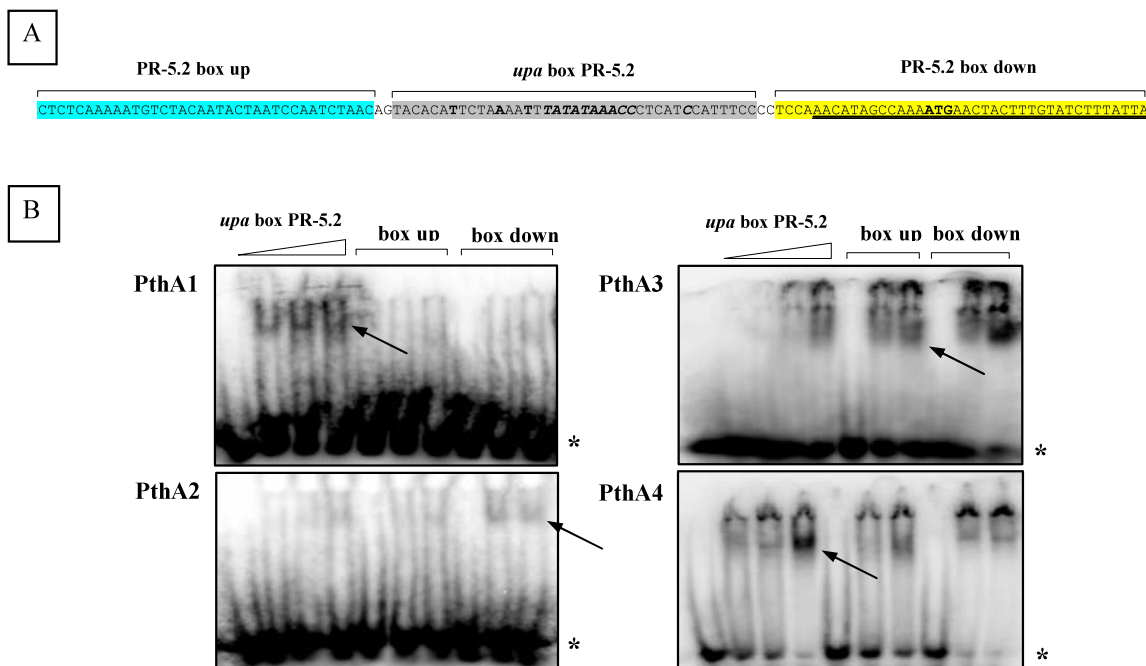


Figura 23. (A) Região promotora do gene *PR5.2*. Três sondas foram sintetizadas para conduzir o experimento de EMSA (*PR-5.2 box up*, *PR-5.2 box down* e *upa box PR-5.2*). (B) Géis de poliácridamida 6% mostrando (através das setas) os complexos DNA proteína. Concentrações de PthAs que foram usadas com o *upa box PR-5.2*: 0, 10, 20 e 30 μmoles de proteína. Para *box up* e *down*, usou-se: 0, 20 e 30 μmoles de PthA. O asterisco indica a sonda livre.

A sequência promotora do gene *PR-1* é mais divergente com relação ao *upa* box do *upa20* de pimenta, no entanto há uma região consenso (ACCATCC) perto do TATA box do gene *Bs3* que está presente apenas no promotor de *PR-1*. Entretanto, essa sequência consenso parece não ser necessária para a ligação de AvrBs3 no promotor de *Bs3* (Römer et al., 2007).

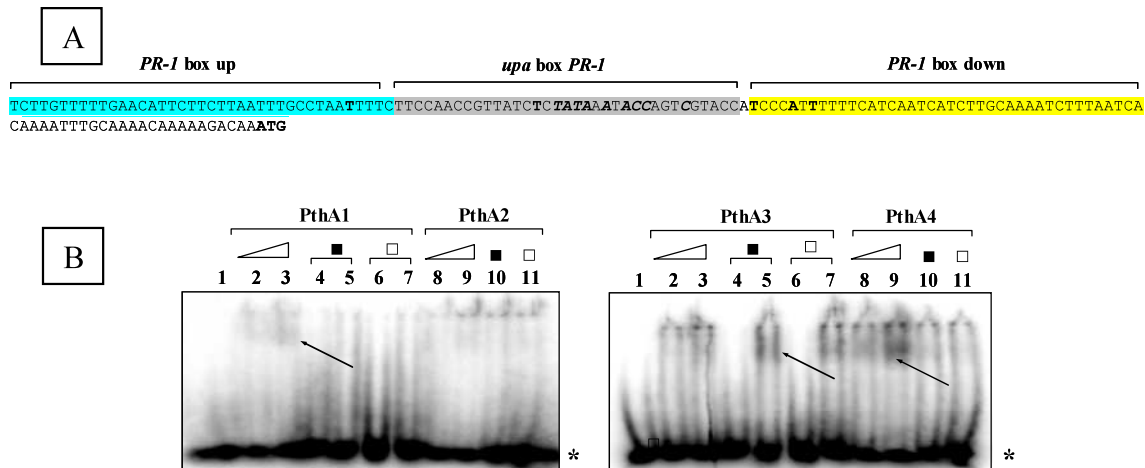


Figura 24. (A) região promotora de *PR-1* indicando as três sondas sintetizadas. Em itálico aparece o TATA box. (B) 1, 4 e 6: sondas livres, *upa* box *PR-1*, *PR-1* box up (■) e *PR-1* box down (□); 2, 3 e 8, 9: PthAs (20 e 30 μmoles) + *upa* box *PR-1*; 5 e 10: PthAs (30 μmoles) + *PR-1* box up; 6 e 11: PthAs (30 μmoles) + *PR-1* box down. A sonda livre está indicada pelos asteriscos e as setas indicam os complexos DNA-proteína.

Análise da expressão transiente de genes repórteres em folhas de *N. benthamiana*

O ensaio histoquímico em folhas de *N. benthamiana* mostrou que as regiões promotoras de *PR-1* ou *PR5-2* dirigem a expressão transitória do gene repórter *uidA*.

Embora não seja mostrado nesta Tese, outros experimentos similares foram realizados com o promotor do gene *PR-1* que indicam que esse promotor também é ativo em folhas de *N. benthamiana*.

A co-expressão do gene repórter (sob o controle do promotor de *PR5.2*) com duas isoformas de *pthA* parece ter um efeito repressor sobre o promotor *PR5.2* (Figura 25). Embora não se demonstra interação *in vivo* entre PthA e a região promotora de *PR5.2*, estes são indícios de que PthA4 regule diretamente a expressão de alguns genes do hospedeiro, como ocorre com AvrBs3 em pimentão (Kay et al., 2007; Römer et al., 2007).

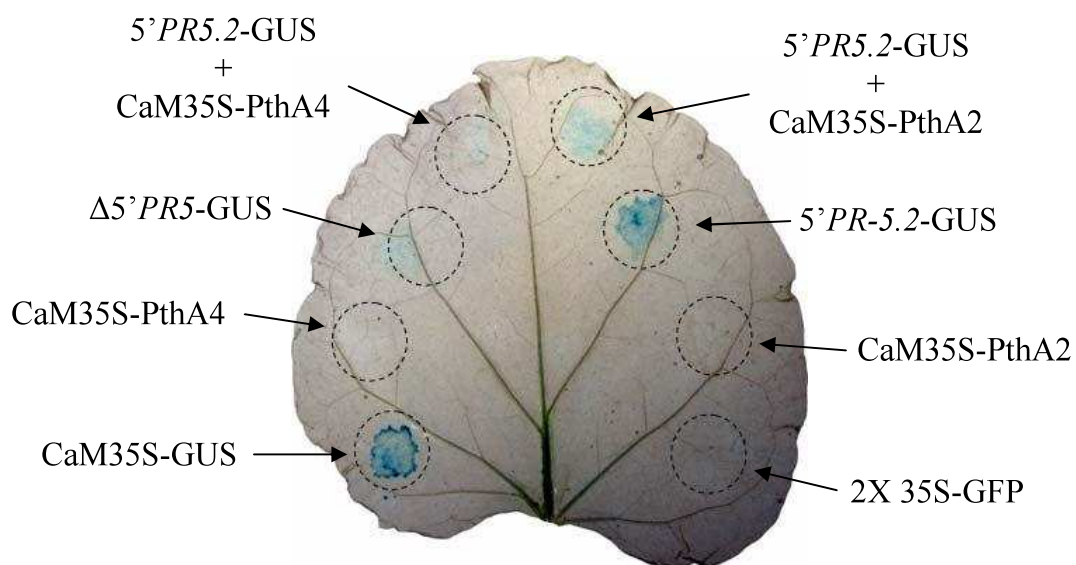


Figura 25. Folha de *N. benthamiana* infiltrada com *A. tumefaciens* (LBA4404) transformado com diferentes construções no vetor pBI121. A construção $\Delta 5'PR5$ -GUS, usado como controle durante neste experimento, tem uma inserção após do TATA box. As variantes *pthA2* ou *pthA4* sobre o controle do promotor viral CaM35S foram infiltradas individualmente ou co-infiltradas com $5'PR5$ -GUS.

DISCUSSÃO GERAL

Esta tese abordou três metodologias diferentes para analisar a expressão gênica de folhas de laranja doce infectadas com *Xanthomonas*. Uma quantidade significativa de genes diferencialmente expressos foi validada por duas estratégias diferentes utilizando replicas biológicas independentes e confirmando os resultados anteriores. Assim, o trabalho resulta no primeiro artigo científico de análise transcricional em larga escala realizado para citros em resposta à bactéria causadora do cancro cítrico.

Além do grande número de genes manipulados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), o estudo também permitiu avaliar respostas de defesa induzidas na planta por *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Xaa), que não causa os sintomas da doença. Notavelmente, o conjunto de genes que são regulados tanto por Xac quanto por Xaa estão associados com respostas de padrões moleculares de patógenos (PAMPs) e já foram descritos em outras interações planta – patógeno. Contudo, comparando-se a mudança nos perfis transcricionais de folhas infiltradas com Xac e Xaa entre 6 e 48h foi possível distinguir as principais diferenças associadas com o desenvolvimento dos sintomas no caso de Xac ou com respostas de defesa para folhas infiltradas com Xaa. No primeiro caso, se destaca a expressão coordenada de genes de metabolismo da parede celular, provavelmente envolvidos no amolecimento da parede que é necessário para alargamento celular (hipertrofia), um dos primeiros sintomas do cancro cítrico. Genes relacionados com o tráfego de vesículas também são induzidos em resposta a *Xanthomonas*. Significativamente, o inibidor do tráfego de vesículas, Brefeldina A, retardou o aparecimento dos sintomas do cancro, mas não teve nenhum efeito visível na resposta a Xaa. Esse fato sugere que o tráfego de vesículas estimulado durante a infecção está relacionado preferencialmente com o desenvolvimento dos sintomas.

A resposta causada por Xaa, é uma resposta típica de HR que reforça-se 48h após infecção, envolvendo genes similares aos genes de resistência, peroxidases, proteínas relacionadas com patogenicidade e quitinases, entre outros. Além disso, há indícios indicando que Xaa ativa uma via de sinalização por MAPK que envolve vários fatores de transcrição do tipo WRKY, genes de defesa e genes envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio. Estes eventos seriam os principais responsáveis pela eficiente resposta de defesa na planta que impede o avanço dessa bactéria.

PthA é um supressor de defesa em planta e assim essencial para o crescimento da bactéria. Foi especulado que Xaa não seja eficiente para injetar efetores de virulência (tipo

PthA) dentro do “não hospedeiro” (laranja) e assim, incapaz de suprimir as defesas dessa planta. O isolado 434 de Xaa possui pelo menos dois efetores similares a PthA, um contendo 17.5 e outro contendo 15.5 repetições do domínio interno (Figura 3). Dados da literatura indicam que as variantes PthB e PthC de isolados Xaa são funcionais nos respectivos hospedeiros, limão verdadeiro e galego (alSaadi et al., 2007). Contudo, resta a hipótese de que as variantes PthCs encontradas na cepa 434 sejam reconhecidas por proteínas R na laranja doce disparando uma resposta tipo HR.

O hormônio vegetal etileno foi relacionado tanto em interações compatíveis quanto incompatíveis entre plantas e patógenos. Em laranja, rapidamente após a infiltração de *Xanthomonas* ocorre o acúmulo de genes da biosíntese de etileno indicando que há aumento na produção desse hormônio durante a interação. No entanto, em 48 h, o gene que codifica para a principal enzima para biosíntese de etileno aparece unicamente induzido por Xaa. Isso está de acordo com o grande número genes de resposta a etileno que são especificamente induzidos por Xaa em 48 h. Portanto, estas evidências indicam que deva haver um vínculo entre o hormônio etileno e as respostas de defesa em plantas de laranja infectadas com Xac.

De particular interesse foi observar de que a expressão de genes relacionados com sinalização e transporte de auxinas e biosíntese de giberelina eram alterados na presença das bactérias. Este fato nos levou a investigar a relação entre esses hormônios e a expressão de genes de remodelamento de parede celular. Durante o crescimento e desenvolvimento das plantas os processos de expansão celular são finamente regulados, em parte, por auxina e giberelina. Durante a expansão celular, o transporte polar de auxinas, a expressão de genes de metabolismo da parede celular e biosíntese de giberelina são processos coordenados que estão fortemente ligados. Os resultados do capítulo II desta tese mostram que tanto auxina ou giberelina induzem a expressão de vários genes para remodelamento da parede e ademais, a auxina NAA induz a expressão de genes de biosíntese de giberelina. Notavelmente, o inibidor de biosíntese de giberelina (CCC) minimizou o acúmulo de genes que eram induzidos por auxina sugerindo que este hormônio aumenta a expressão de genes de remodelamento da parede, pelo menos em parte, através do estímulo da biosíntese de giberelina. A conclusão que surge a partir destes resultados é que Xac manipula a via de sinalização de auxina aumentando a produção de giberelina e como consequência disso, ocorre indução de genes alvos para o amolecimento da parede celular. Além disso, apresentam-se indícios de regulação postranscricional à via de sinalização de auxina

mediados por micro RNAs. Esse mecanismo de regulação foi demonstrado em outras plantas e envolve a participação de proteínas DICER que também foram descritas no capítulo II desta tese.

Genes que codificam proteínas relacionadas com patogenicidade foram fortemente induzidos por Xac e Xaa em folhas de laranja. Por isso, as regiões promotoras dos genes *PR-1* e *PR-5.2* foram clonadas e caracterizadas. Experimentos de expressão transiente utilizando *Agrobacterium* mostraram que os promotores isolados dirigem a expressão do gene repórter *uidA* em folhas de *N. benthamiana*.

Notavelmente, foram encontrados sítios consenso nos promotores de *PR-1* e *PR-5.2* que também estão presentes nos promotores de *upa20* e *Bs3*. Em pimenta, tais sítios foram denominados *upa* box e são os principais alvos de AvrBs3 de *Xanthomonas campestris vesicatoria*. No capítulo III desta Tese, demonstrou-se que os principais efetores de virulência de Xac são proteínas capazes de ligar DNA. Principalmente a variante PthA4, que é o análogo estrutural de AvrBs3, se liga com preferência às regiões tipo *upa* box presentes nos promotores gênicos de *PR-1* e *PR-5.2*.

Tudo indica que PthA é injetado no hospedeiro para suprimir as defesas manipulando a expressão gênica da planta. Nesse contexto, não ficou claro o vínculo entre o forte acúmulo de proteínas PR, que participam na resposta de defesa, e o desenvolvimento dos sintomas da doença. Embora tenha sido relatado que PR-5 tem um efeito protetor contra oomicetes, a função de proteínas PR em citros em resposta a fitobactérias ainda não está clara. Experimentos preliminares de expressão transiente do gene repórter *uidA* sob controle do promotor de *PR-5.2* em folhas de *N. benthamiana* mostraram o possível efeito dos efetores PthA2 e PthA4 sobre a atividade do gene repórter. Os efetores PthAs sob o controle do promotor viral CaM35 localizam-se no núcleo de células de *N. benthamiana* 48h após agroinfiltração (Domingues e Benedetti, pesquisas em andamento) e causam HR nessa planta 72 hai. A coexpressão de PthAs com o gene repórter sob controle do promotor *PR-5.2* apresentou uma diminuição da atividade desse promotor sugerindo que os efetores de virulência ao ligar no sítio tipo *upa* box de *PR-5.2* atua como um repressor transcricional. Neste caso estaria claro o efeito supressor de defesa de PthAs em citros mas ainda resta explicar a forte indução de PRs 48 hai com Xac. Uma hipótese para explicar isto é que 48 hai é um tempo insuficiente para Xac ter transferido suficiente quantidade de PthA para à célula hospedeira e portanto o efeito repressor ainda não foi alcançado. Por outro lado, como não demonstramos que ocorra interação *in vivo* entre PthA e *upa* box de *PR5.2*,

elaborou-se a seguinte alternativa para explicar a observação anterior, onde a morte celular programada (HR) disparada por PthA em *N. benthamiana* tenha efeito direto na degradação de proteínas em 72 hai, consequentemente diminuindo os níveis da proteína GUS.

BIBLIOGRAFIA

- Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimhan ML, Reuveni M, Zhu JK, Niu X, Singh NK, Hasegawa PM and Bressan RA (1996) Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Sci* 118: 11-23
- Albrecht, U., Bowman, K.D. (2008) Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck after infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. *Plant Science* 175(3): 291-306
- Alegria MC, Docena C, Khater L, Ramos CH, da Silva AC, Farah CS. (2004) New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III Secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* Pathovar citri. *J Bacteriol* 186: 6186-6197
- Al-Saadi A, Reddy JD, Duan YP, Brunings AM, Yuan Q, Gabriel DW (2007) All five host-range variants of *Xanthomonas citri* carry one pthA homolog with 17.5 repeats that determines pathogenicity on citrus, but none determine host-range variation. *Mol Plant Microbe Interact.* 20(8): 934-43.
- Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos (ABECitrus - Outubro de 2008) <http://www.abecitrus.com.br>
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JD, Smith JA, Struhl K (1994) Current Protocols in Molecular Biology.
- Badescu GO and Napier RM (2006) Receptors for auxin: will it all end in TIRs? *Trends Plant Sci.* 11(5): 217-23
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116(2): 281-97. Review
- Belasque Jr. J, Parra AL, Chagas MCM, Behe C, Ayres AJ, Parra JRP, Hartung JS (2001) Interaction of citrus bacterial canker, citrus leaf miner and pest management. *Phytopathology* 91 (supplement): S7
- Bonas U, Stall RE, Staskawicz B (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene AvrBs3 from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* 218: 127-136

- Brunings AM and Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol.* 4: 141-57
- Büttner D and Bonas U (2002) Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *EMBO J.* 21: 5313-5322
- Campos MA, Rosa, DD, Teixeira JEC, Targon MLPN, Souza AA, Paiva LV, Stach-Machado DR and Machado MA (2007) PR gene families of citrus: their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. *Genet. Mol. Biol.* 30 (3): 917-930
- Carrello A, Allan RK, Morgan SL, Owen BA, Mok D, Ward BK, Minchin RF, Toft DO, Ratajczak T. (2004) Interaction of the Hsp90 cochaperone cyclophilin 40 with Hsc70. *Cell Stress Chaperones.* 9(2): 167-81
- Cereghini S, Blumenfeld M, and Yaniv M (1988) A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells. *Genes & Dev.* 2: 957-974
- Cernadas RA, Camillo LR e Benedetti CE (2008a) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. *Mol. Plant Pathol.* 9 (5): 609–631
- Cernadas RA, Benedetti CE (2008b) Auxin and Gibberellin-mediated expression of cell wall remodeling genes induced by *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Plant physiol and biochem* (submetido)
- Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Durán-Vila N, Navarro L, Peña L (1998) Genetic transformation and regeneration of mature tissues of wood fruit plants bypassing the juvenile stage. *Transgenic Res.* 7: 51-59
- Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich D, Grandchamp B, Rosa J, Goossens M, Romeo PH (1988) Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene results either in tissue-specific or in housekeeping expression. *PNAS* 85: 6-10
- Coaker G, Zhu G, Ding Z, Van Doren SR, Staskawicz B. (2006) Eukaryotic cyclophilin as a molecular switch for effector activation. *Mol Microbiol.* 61(6): 1485-96

- Duan YP, Castaneda AL, Zhao G, Erdos G, GAbriel DW (1999) Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2: 556-560
- Estanislau et al. (2001) Laranjas e sucos: aspectos econômicos. *Informe agropecuário*, v.22, p.8-20
- Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, Hinarejos C, Tuset JJ, Arnau J, Pina JA, Navarro L and Pena L (2001) Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. *Mol Breed* 7: 175-185
- Finnegan EJ, Matzke MA (2003) The small RNA world. *J Cell Sci.* 116: 4689-93
- Fouts DE, Badel JL, Ramos AR, Rapp RA, Collmer A (2003) A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Hrp (Type III secretion) deletion mutant expressing the Hrp system of bean pathogen *P. syringae* pv. *syringae* 61 retains normal host specificity for tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 43-52
- Frigerio M, Alabadi D, Perez-Gomez J, Garcia-Carcel L, Phillips AL, Hedden P, Blazquez MA (2006) Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 142(2): 553-63
- Gottwald TR, Graham JH, Civerolo EL, Barrett HC, Hearn CJ (1993) Differential host range reaction of citrus and citrus relatives to citrus canker and citrus bacterial spot determined by leaf mesophyll susceptibility. *Plant Disease* 77(10): 1004-1009
- Gottwald, T.R. (2000) Citrus canker. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1002-01
- Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS (2002) Citrus canker: the pathogen and its impact. *On line Plant Health Progress* doi: 10.1094/PHP-2002-0812-01-RV
- Gu K, Yang B, Tian D, Wu L, Wang D, Sreekala C, Yang F, Chu Z, Wang GL, White FF, Yin Z. (2005) R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435: 1122-5
- Gürlebeck D, Szurek B and Bonas U (2005) Dimerization of the bacterial effector protein AvrBs3 in the plant cell cytoplasm prior to nuclear import. *Plant J.* 42(2):175-87

- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system *Plant Molecular Biology Reporter*. 5(4): 387-405
- Jenkins CL and Starr MP (1985) Formation of halogenated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments by the type and other yellow-pigmented strains of *Xanthomonas maltophilia*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. v.136B, p.257-264
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. (2006) MicroRNAs And Their Regulatory Roles In Plants. *Annu Rev Plant Biol*. 57: 19-53
- Jung HW, Hwang BK (2000) Isolation, partial sequencing, and expression of pathogen-related cDNA genes from pepper leaves infected by *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 13: 136-142
- Kay S, Hahn S, Marois E, Hause G and Ulla Bonas (2007) A Bacterial Effector Acts as a Plant Transcription Factor and Induces a Cell Size Regulator. *Science* 318: 648-651
- Koizumi M, Kimijima E, Tsukamoto T, Togawa M, Masui S (1996) Dispersion of citrus canker bacteria in droplets and prevention with windbreaks. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, Sun City, South Africa, 12-17 Maio.
- Lahaye, T and Bonas, U (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci*. 6: 479-485
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-71
- Marois E, van den Ackerveken G, Bonas U (2002) The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 15: 637-646
- Martinez-Godoy MA, Mauri N, Juarez J, Marques MC, Santiago J, Forment J, Gadea J (2008) A genome-wide 20 K citrus microarray for gene expression analysis. *BMC Genomics* 9: 318
- Melchers LS, Apotheker-de Groot M, van der Knaap JA, Ponstein AS, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJ, van den Elzen PJ and Linthorst HJ (1994) A new class of

- tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J.* 5: 469-480
- Mendes BMJ, Boscariol RL, Mourão Filho FAA, Almeida WAB (2002) Agrobacterium-mediated genetic transformation of ‘Hamlin’ sweet orange. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasilia 37(7): 955-961
- Mendes-da-Glória FJ, Mourão Filho FAA, Camargo LEA, Mendes BMJ (2000) Caipira sweet orange + Rangpur lime: a somatic hybrid with potential for use as rootstock in the Brazilian citrus industry. *Genet. Mol. Biol.* 23: 661-665
- Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, Lawrence SD, Cline K (1992) Agrobacterium-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 11: 238-242
- Moura TL, Almeida WAB, Mendes BMJ, Mourão Filho FAA (2001) Organogênese in vitro de Citrus em função de concentrações de BAP e seccionamento do explante. *Rev. Bras. Frutic.* Jaboticabal 23 (2): 240-245
- Mysore KS, Crasta OR, Tuori RP, Folkerts O, Swirsky PB, Martin GB (2002) Comprehensive transcript profiling of Pto- and Prf-mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. *Plant J.* 32: 299-315
- Namekata, T (1971) Estudos de *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow. N. F. sp. aurantifolia, agente causal da cancriose do limoeiro Galego. Piracicaba, *Tese de Doutorado*, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo
- Narasimhan ML, Damsz B, Coca MA, Ibeas JI, Yun DJ, Pardo JM, Hasegawa PM and Bressan RA (2001) A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol Cell.* 8: 921-930
- Nascimento JF, Rodrigues Neto J, Alves JMA, Rego M, Araújo AES (2003) Ocorrência de cancro cítrico no estado de Rondônia. *Anais do Congresso Paulista de Fitopatologia*, 26
- Neves MF, Lopes FF, Rossi RM, Melo Pao (2004) Agroindustry production chain analysis methods as applied to citriculture. *Rev. Bras. Frutic.* v.26, p.468-473

- Olivera RP, Cristofani M, Aguilar-Vildoso CI, Machado MA (2002) Diversidade genética entre híbridos de tangerina ‘Cravo’ e laranja ‘Pera’. *Pesq. Agropec. Bras.* Brasília 37(4): 479-484
- Osmond RI, Hrmova M, Fontaine F, Imberty A and Fincher GB (2001) Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)-beta-D-glucans. Kinetics, specificity, structural analysis and biological implications. *Eur J Biochem.* 268: 4190-4199
- Pavoncello D, Lurie S, Droby S and Porat R (2001) A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. *Physiol Plantarum* 111: 17-22.
- Peña L, Cervera M, Juárez J, Navarro A, Pina JA, Navarro L (1997) Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep.* 16: 731-737
- Pieterse MJ and Van Loon LC (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 456–464
- Porat R, Lers A, Dori S, Cohen L, Weiss B, Daus A, Wilson CL and Droby S (1999) Induction of chitinase and beta-1,3- endoglucanase proteins by UV irradiation and wounding in grapefruit peel tissue. *Phytoparasit* 27: 233-238.
- Porat R, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt EE and Droby S (2003) Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by beta-aminobutyric acid. *Eur J Plant Pathol* 109: 901-907.
- Rodrigues Neto J, Baldini Ribeiro JG (2002) Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico. Editado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento /SDA/DDIV – Brasília
- Römer P, Hahn S, Jordan T, Strauß B, Bonas U and Lahaye T (2007) Plant Pathogen Recognition Mediated by Promoter Activation of the Pepper Bs3 Resistance Gene. *Science* 318: 645-648
- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual, third edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.

- Schornack S, Meyer A, Römer P, Jordan T, Lahaye TJ (2006) Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *J Plant Physiol.* 163(3): 256-72.
- Seo PJ, Lee AK, Xiang F, Park CM (2008) Molecular and Functional Profiling of *Arabidopsis* Pathogenesis-Related Genes: Insights into Their Roles in Salt Response of Seed Germination. *Plant Cell Physiol.* 49(3): 334-44
- da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, Monteiro-Vitorello CB, Van Sluys MA, Almeida NF, Alves LM, do Amaral AM, Bertolini MC, et al. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, 417, 459–463.
- Sugio A, Yang B, Zhu T, White FF. (2007) Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OsTFIIAgamma1* and *OsTFXI* during bacterial blight of rice. *PNAS* 104(25): 10720-5
- Sun X, Stall RE, Cubero J, Gottwald TR, Graham JH, Dixon WN, Schubert TS, Peacock ME, Dickstein ER and Chaloux PH (2000) Detection of a unique isolate of citrus canker bacterium from Key lime in Wellington and Lake Worth, Florida. (Abstract). *In Proceedings of the International Citrus Canker Research Workshop*, Ft. Pierce, FL, 20–22 June 2000. Division of Plant industry. Florida Department of Agriculture and Consumer Services. <http://www.doacs.state.fl.us/~pi/abstracts.pdf>>
- Stall RE, Seymour CP (1983) Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. *Plant Dis.* 67: 581-585
- Swarup S, De Feyter R, Bransky RH, Gabriel DW (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas campestris* to form cankerlike lesions on citrus. *Phytopathology* 81: 802-809
- Swarup S, Yang Y, Kingsley MT, Gabriel DW (1992) An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. *Mol. Microbe-Plant Interact.* 5: 204-213
- Szurek, B., Marois, E., Bonas, U., van den Ackerveken, G. (2001) Eukaryotic features of the *Xanthomonas* type III effector AvrBs3: protein domains involved in transcriptional

- activation and the interaction with nuclear import receptors from pepper. *Plant J.* 26: 523-534
- Szurek B, Rossier O, Hause G and Bonas U (2002) Type III dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Mol. Microbiol.* 46, 13–23.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G and Katagiri F (2003) Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell.* 15: 317-330
- Thieme, F., R. Koebnik, T. Bekel, C. Berger, J. Boch, D. Büttner, C. Caldana, L. Gaigalat, A. Goesmann, S. Kay, O. Kirchner, C. Lanz, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, G. Mittenhuber, D. H. Nies, U. Niesbach-Klösgen, T. Patschkowski, C. Rückert, O. Rupp, S. Schneiker, S. C. Schuster, F. Vorhölter, E. Weber, A. Pühler, U. Bonas, D. Bartels, and O. Kaiser. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* 187: 7254-7266
- Thilmony R, Underwood W, He SY. (2006) Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. *Plant J.* 46(1): 34-53
- Van Loon LC, Rep M and Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 44: 135-162
- Verniere, C., Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Civerolo, E.L., Alvarez, A.M., Maestri, P. and Luisetti, J. (1998) Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 477–487
- Wall L, de Boer E, Grosveld F (1988) The human beta-globin gene 3' enhancer contains multiple bindingsites for an erythroid-specific protein. *Genes & Dev.* 2: 1089-1100
- Wang JW, Wang LJ, Mao YB, Cai WJ, Xue HW, Chen XY. (2005) Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 17(8): 2204-16
- Ward BK, Allan RK, Mok D, Temple SE, Taylor P, Dornan J, Mark PJ, Shaw DJ, Kumar P, Walkinshaw MD, Ratajczak T. (2002) A structure-based mutational analysis of

- cyclophilin 40 identifies key residues in the core tetratricopeptide repeat domain that mediate binding to Hsp90. *J Biol Chem.* 277(43): 40799-809
- Whitmore L and Wallace BA (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* 32: 668-673
- Whitmore L and Wallace BA (2008) Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases. *Biopolymers* 89:392-400.
- Yang B, Sugio A, White FF (2006) *Os8N3* is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *PNAS* 103(27): 10503-8
- Yoda H, Ogawa M, Yamaguchi Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H (2002) Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol. Genet. Genomics* 267: 154-161
- Zhang B, Pan X, Cannon CH, Cobb GP, Anderson TA. (2006) Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant J.* 46(2): 243-59

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada: Análise da Expressão Diferencial de Genes de Citros em Resposta a Infecção por *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* e *Xanthomonas axonopodis* pv *aurantifolii*. Isolamento de promotores que Controlam a Expressão de Genes Precocemente Induzidos pelo Patógeno.

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(X) está inserido no **Projeto CIBio/IB/UNICAMP** (Protocolo nº CEB 03.01), intitulado Análise da Expressão Gênica em Citrus sinensis em Resposta à Infecção por *Xanthomonas citri* e *Xanthomonas aurantifolii*.

() tem autorização da **Comissão de Ética em Experimentação Animal/IB/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização do **Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/FCM/UNICAMP** (Protocolo nº _____);

() tem autorização de comissão de bioética ou biossegurança externa à UNICAMP.
Especificar: _____

Aluno:

Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Nome:

Função:

Prof. Dra. HELENA COUTINHO DE OLIVEIRA
Presidente
Comissão Interna de Biossegurança
CIBio/IB - UNICAMP

Formulário de encaminhamento de projetos de pesquisa para análise pela CIBio - Comissão Interna de Biossegurança da

ABTLuS - Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron

Título do projeto:

Análise da expressão gênica em *Citrus sinensis* em resposta à infecção por *Xanthomonas citri* e *Xanthomonas aurantifolii*.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Experimentador: Raul Andrés Cernadas

Nível do treinamento do experimentador:

- ☐ Iniciação científica
- ☐ mestrado
- ☐ doutorado
- ☒ doutorado direto
- ☐ pós-doutorado
- ☐ nível técnico
- ☐ outro, especifique: _____

Resumo do projeto:

O presente projeto visa uma análise da expressão gênica em larga escala em folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) infectadas com as bactérias *Xanthomonas citri* e *Xanthomonas aurantifolii* através das técnicas de differential display, hibridização subtrativa e microarray. Plantas de laranja doce da variedade Pera Rio serão infiltradas com suspensões da bactéria *X. citri*, causadora do cancro cítrico, ou com a bactéria *X. aurantifolii*, que causa cancro apenas no limão galego. RNA total de folhas infiltradas com *X. citri*, *X. aurantifolii* ou água, como controle, serão usados nos experimentos de differential display, hibridização subtrativa e microarray. Os genes identificados como diferencialmente expressos nesse tratamento serão agrupados de acordo com sua função, relativo a sua homologia com seqüências gênicas de outros organismos depositadas em banco de dados. Espera-se identificar uma grande quantidade de genes envolvidos tanto no desenvolvimento dos sintomas do cancro como na resposta de defesa observada na interação laranja doce-*X. aurantifolii*.

A CIBio analisou este projeto em reunião realizada no dia

27.08.2007

Parecer final: ☒ projeto aprovado

☐ projeto recusado

☐ projeto com deficiências, favor comentários abaixo:

Comentários:

Presidente de CIBio - ABTLuS

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Alfonsineclup

Membro da CIBio - ABTLuS

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Nilson Ivo Tonin Zanchin

Presidente de CIBio - ABTLuS

Jörg Kobarg

Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin