



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LETÍCIA KUSTER MITRE

RECEPTORES LRR-RK ASSOCIADOS AO
RECONHECIMENTO DE PAMPS PARA O AUMENTO DA
RESISTÊNCIA A DOENÇAS BACTERIANAS DE CITROS

LRR-RK RECEPTORS ASSOCIATED WITH PAMP
RECOGNITION TO INCREASE RESISTANCE AGAINST
CITRUS BACTERIAL DISEASE

CAMPINAS

2020

LETÍCIA KUSTER MITRE

**RECEPTORES LRR-RK ASSOCIADOS AO
RECONHECIMENTO DE PAMPS PARA O AUMENTO DA
RESISTÊNCIA A DOENÇAS BACTERIANAS DE CITROS**

**LRR-RK RECEPTORS ASSOCIATED WITH PAMP
RECOGNITION TO INCREASE RESISTANCE AGAINST
CITRUS BACTERIAL DISEASE**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do Título de Doutora em
Genética e Biologia Molecular, na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.*

*Thesis presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for
the degree of Doctor in Genetics and
Molecular Biology, on the area of Plant
Genetics and Breeding.*

Orientador: Alessandra Alves de Souza

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA LETÍCIA KUSTER MITRE E ORIENTADA
PELA ALESSANDRA ALVES DE SOUZA.

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M697r Mitre, Leticia Kuster, 1989-
Receptores LRR-RK associados ao reconhecimento de PAMPs para o aumento da resistência a doenças bacterianas de citros / Leticia Kuster Mitre. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Alessandra Alves de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Receptores de reconhecimento de padrão. 2. Cancro cítrico. 3. Clorose variegada dos citros. 4. Plantas transgênicas. 5. Padrões moleculares associados a patógenos. I. Souza, Alessandra Alves de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: LRR-RK receptors associated with PAMP recognition to increase resistance against citrus bacterial disease

Palavras-chave em inglês:

Receptors, Pattern recognition

Citrus canker

Citrus variegated chlorosis

Transgenic plants

Pathogen-associated molecular pattern molecules

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Alessandra Alves de Souza [Orientador]

Celso Eduardo Benedetti

Claudia Barros Monterios Vitorello

Maxuel de Oliveira Andrade

Paulo José Pereira Lima Teixeira

Data de defesa: 24-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3871-0289>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6053869077438772>

Campinas, 24 de janeiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Alessandra Alves de Souza

Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello

Dr. Celso Eduardo Benedetti

Dr. Maxuel de Oliveira Andrade

Dr. Paulo José Pereira Lima Teixeira

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

Àqueles que são base dessa conquista: mãe, pai e irmã. Agradeço por acreditarem no meu potencial e me incentivarem emocionalmente para finalizar mais um objetivo da minha carreira.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo imprescindível apoio financeiro disponibilizado para o desenvolvimento do Doutorado no Brasil (Processo:142014/2015-0), com período sanduíche no exterior (Processo: 208406/2017-4). Ainda, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de realizar o Doutorado em uma instituição que se dedica em garantir a excelência na educação para formar profissionais competitivos.

Ao Centro de Citricultura ‘Sylvio Moreira’ – Instituto Agrônomo de Campinas por proporcionar o desenvolvimento da pesquisa de Doutorado em um instituto de pesquisa que a décadas se dedica em gerar e transferir conhecimento científico e tecnológico relevantes para a citricultura.

À minha orientadora Dra. Alessandra Alves de Souza por me acolher em seu grupo de pesquisa e confiar a mim este trabalho. Você soube me motivar na hora certa, deu todos os recursos para execução das atividades e sempre manteve a harmonia do grupo, que foram cruciais para me manter determinada a superar todos os desafios encontrados. Sua orientação foi fundamental para meu crescimento pessoal e profissional.

À minha orientadora do período de doutorado sanduiche nos EUA, Dra. Maeli Melotto, pela orientação e colaboração que foram fundamentais para o desenvolvimento de parte desse trabalho. Agradeço também ao seu grupo de pesquisa, que me auxiliaram diariamente na execução dos experimentos na UC-Davis.

À Dra. Raquel Caserta e Dra. Natália Teixeira, que além de grandes amigas, foram fundamentais para meu treinamento, discussão e execução dos experimentos no laboratório. Aos funcionários, estagiários e pós-graduando da Biotecnologia pelo convívio harmonioso, conversas e pelas amizades sólidas conquistadas. Aos integrantes do grupo Double X (Paula, Simone, Reinaldo, Willian, Cristiano, César, Isis, Eduarda, Maria Júlia, Mariana) e a minha amiga Bianca por me acolherem como família em Araras. Agradeço imensamente à Anita, Rose e Cícera pelo cafezinho diário e por todo suporte no laboratório. À minhas amigas

Tatyana e Najara, que sempre me deram grande suporte em Campinas. Além de compartilharem horas de estudos durante as disciplinas, vocês me ajudaram a superar os estresses e aflições da pós-graduação.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho.

RESUMO

As plantas apresentam receptores de membrana que são capazes de reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno/microrganismo (PAMPs/MAMPs), os quais são cruciais para a ativação do sistema imune. O receptor EFR, restrito a família das Brassicaceae, é um dos receptores de reconhecimento de padrões (PRR) mais bem estudado. Esse receptor quinase com repetições ricas em leucina em seu domínio extracelular (LRR-RK) é capaz de perceber a proteína ET-Tu das bactérias e seu epítipo elf18. A transferência desse receptor para outras espécies revelou a possibilidade de aumentar a resistência a bacterioses em culturas como tomate, arroz, trigo e batata. Diante disso, foram desenvolvidas variedades de laranja doce superexpressando o gene *EFR* para conferir resistência em amplo espectro a duas das principais doenças bacterianas de citros, cancro cítrico e clorose variegada dos citros (CVC). As linhagens transgênicas foram capazes de reconhecer os peptídeos elf18_{Xcc} e elf26_{Xf} derivados das bactérias *Xanthomonas citri* e *Xylella fastidiosa*, respectivamente, ativando o sistema imune da planta. Além da ativação de espécies reativas de oxigênio (ROS), indução de MAPK e de genes de defesa, foi possível verificar gradual aumento da resistência ao cancro cítrico e CVC em alguns eventos em comparação com o wild-type (WT). Nesse trabalho, também foram realizadas análises *in silico* de um candidato a receptor LRR-RK altamente expresso em *Citrus reticulata* (resistente a CVC). Os resultados mostraram que o receptor putativo CrLRR-RK e seu ortólogo em *Citrus sinensis* (espécie suscetível) codificam proteínas com domínios conservados. Contudo, existem substituições de aminoácidos entre elas que sugerem mudanças conformacionais na estrutura tridimensional das proteínas, de acordo com a predição do modelo proteico gerado pelo I-Tasser. Isso poderia explicar as diferenças no reconhecimento de patógeno por laranja doce e tangerina, sendo um indicativo de que CrLRR-RK está associado ao reconhecimento de PAMPs derivados de *X. fastidiosa*. Para provar essa hipótese, foram produzidas plantas de *Arabidopsis* expressando *CrLRR-RK* e receptores quiméricos entre CrLRR-RK e o receptor FLS2. Essas plantas darão suporte a estudos futuros para comprovar empiricamente a funcionalidade desse receptor e buscar por PAMPs capazes de se ligarem ao domínio extracelular da proteína. Também foram produzidas variedades comerciais de laranja doce expressando o gene *CrLRR-RK* na tentativa de se obter maior nível de tolerância a patógenos bacterianos de citros. Juntos, esses resultados indicam que a utilização de receptores LRR-RK é uma estratégia que possui grande potencial para aumentar a resistência em amplo espectro em citros e futuramente poderão suportar os programas de melhoramento genético.

ABSTRACT

Plants employ cell surface receptors that recognize pathogen (or microbe)-associated molecular patterns (PAMPs/MAMPs), which are crucial for immune system activation. The EFR receptor, restrict to the Brassicaceae family, is one of the well-studied pattern recognition receptors (PRR). This leucine-rich repeat receptor kinase (LRR-RK) is capable to recognize the widely conserved bacterial PAMP EF-Tu and its derived peptide elf18. The interfamily transference of the EFR receptor revealed the possibility to increase crop disease resistance in species such as tomato, rice, wheat and potato. Here, we developed sweet orange varieties expressing *EFR* to confer broad-spectrum resistance, focused on the two major citrus bacterial diseases citrus canker and citrus variegated chlorosis (CVC). The transgenic lines were able to sense elf18_{Xcc} and elf26_{Xf} derived peptides from *Xanthomonas citri* and *Xylella fastidiosa*, respectively, activating the immune system of the plant. A quick oxidative burst was detected, followed by MAPK activation and induction of defense marker genes. In addition, it was possible to verify a gradual increase of resistance to citrus canker and CVC and a greater capacity to control bacterial growth in some transgenic lines compared to the wild type (WT). Here, we also performed *in silico* analyzes of an overexpressed LRR-RK receptor on *Citrus reticulata* (CVC resistant). The results showed that the putative receptor CrLRR-RK and its ortholog in *Citrus sinensis* (susceptible species) encode conserved domain proteins. However, there are amino acid substitutions between them that led to conformational changes in the 3D structure of proteins, according to the protein model generated by I-Tasser. This would explain the differences in pathogen recognition by sweet orange and mandarin, indicating that CrLRR-RK is associated with the recognition of *X. fastidiosa*-derived PAMPs. To prove this hypothesis, *Arabidopsis* plants expressing *CrLRR-RK* and chimeric receptors between CrLRR-RK and the FLS2 receptor were produced. These plants will support future studies to empirically prove the receptor functionality and seek for PAMPs capable of binding in the extracellular domain. We also produced commercial varieties of sweet orange expressing the *CrLRR-RK* gene in order to obtain a higher level of tolerance against citrus bacterial pathogens. Together, these results indicate that the use of LRR-RK receptors is a strategy that has great potential for increasing broad-spectrum resistance in citrus and hereafter support breeding programs.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	11
1.1 A representatividade do setor citrícola no agronegócio brasileiro.....	11
1.2 Principais doenças bacterianas que impactam a citricultura.....	12
1.2.1 Clorose variegada dos citros.....	12
1.2.2 Cancro Cítrico	16
1.3 Imunidade inata das plantas	18
1.4 Utilização do receptor EFR para conferir resistência em amplo espectro em culturas de importância econômica.....	20
1.5 Utilização de receptores PRRs para aumentar a resistência a doenças bacterianas em citros.....	22
2. Objetivos.....	24
3. Referências	24

CAPÍTULO I: The *Arabidopsis* EFR receptor can recognize citrus bacterial pathogens and confer resistance in transgenic sweet orange

Summary	33
Introduction.....	34
Material and Methods	36
Genetic transformation.....	36
Molecular analysis of transformed plants	36
Gene expression analysis by RT-qPCR	37
ROS production assay	37
MAP kinase assay	37
Evaluation of citrus canker resistance.....	38
Evaluation of <i>X. fastidiosa</i> behavior in transgenic plants	38
Results.....	39
Development of transgenic sweet orange expressing EFR gene.....	39
EFR citrus plants confers responsiveness to citrus bacterial pathogens	40
elf peptides activate MAPK and defense-related genes in EFR citrus plants	43
Transgenic sweet orange expressing <i>EFR</i> shows increased resistance to citrus canker.....	44
<i>EFR</i> transgenic lines prevent <i>X. fastidiosa</i> movement and decrease CVC symptoms	46
Discussion.....	48
References.....	51
Support Information.....	54

CAPÍTULO II: Caracterização *in silico* e análise funcional do candidato a receptor CrLRR-RK e desenvolvimento de plantas transgênicas de *Arabidopsis* e laranja doce 55

Resumo	55
1. Introdução	56
2. Objetivos	58
3. Material e Métodos.....	58
3.1 Análise <i>in silico</i> do gene candidato <i>CrLRR-RK</i>	58
3.2 Sequências gênicas e vetores para transformação genética de plantas	59
3.3 Síntese dos genes quiméricos e clonagem no vetor de expressão para transformação de <i>Arabidopsis</i>	60
3.4 Transformação genética de <i>Arabidopsis</i>	61
3.5 Transformação genética de citros	62
3.6 Confirmação das linhagens transgênicas de <i>Arabidopsis</i> e laranja doce.....	63
3.7 Avaliação da expressão gênica dos eventos de laranja doce expressando <i>CrLRR-RK</i>	63
3.8 Desafio de plantas transgênicas com <i>X. fastidiosa</i>	64
4. Resultados e Discussão	64
4.1 Caracterização <i>in silico</i> do receptor putativo CrLRR-RK e seu ortólogo em <i>C. sinensis</i>	64
4.2 Desenvolvimento de plantas de <i>Arabidopsis</i> expressando o receptor CrLRR-RK	68
4.2.1 Síntese de genes quiméricos	69
4.2.2 Construção do vetor de expressão	70
4.2.3 Desenvolvimento de plantas de <i>Arabidopsis</i> expressando os genes <i>LRR-RK</i>	71
4.3 Desenvolvimento de plantas de laranja doce expressando o gene <i>CrLRR-RK</i> para avaliação da resposta de defesa a patógenos bacterianos de citros.....	76
4.3.1 Obtenção e confirmação de plantas de laranja doce expressando <i>CrLRR-RK</i>	76
4.3.2 Ensaios de desafio com a bactéria <i>X. fastidiosa</i>	80
5. Perspectivas.....	82
6. Referências	83
7. Conclusão Geral.....	87
8. Anexos	88

1. Introdução Geral

1.1 A representatividade do setor citrícola no agronegócio brasileiro

O agronegócio brasileiro é uma grande potência nacional e o grande responsável por proteger nossa economia, uma vez que representa cerca de 21% do PIB (CEPEA, 2019). Além de suprir as necessidades do mercado interno, o Brasil é um dos maiores exportadores mundiais e tem como base da produção agrícola produtos tais como: soja, milho, café, suco de laranja, algodão, açúcar, etanol e carnes (bovina, suínas e aves). Sem dúvidas a produção agrícola será uma das grandes protagonistas do futuro, já que há a necessidade da expansão da produção de alimento para suprir a demanda do crescimento populacional nos países em desenvolvimento. Na estimativa de 2016, foi calculado que a produção agrícola do país correspondia a 7,8% do território nacional, equivalentes a 65.913.738 hectares (Embrapa, 2019). Contudo, a modernização da agricultura, aliada a práticas sustentáveis de manejo, cultivo e preservação dos recursos naturais, nos permite expandir e intensificar a produção agrícola cada vez mais.

A citricultura é uma das principais cadeias produtivas do agronegócio e contribui diretamente para o desenvolvimento socioeconômico do estado de São Paulo. A região central do estado de SP e o Triângulo Mineiro, fazem parte do cinturão citrícola por serem o maior centro produtor do país. Mas estados como a Bahia, Paraná, Sergipe e Rio Grande do Sul também possuem regiões de produção relevantes. Apenas no estado de São Paulo são produzidas quase 80% de toda a laranja, que é o principal produto citrícola. A grande maioria da laranja produzida é destinada a produção de suco de laranja e o Brasil é responsável por produzir cerca 60% do suco de laranja consumido no mundo (USDA, 2019). Os pomares de laranja ocupam um total de 408.825 hectares e possuem 195,27 milhões de árvores plantadas, com predominância de laranja Pera Rio, que engloba 35% da área de produção. Na última estimativa de safra 2019/20 realizada pela Fundecitrus, são esperadas a produção de 388,42 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg. Esse valor supera a safra de 2018/19 (285,98 milhões de caixa) em 36%, que foi a pior dos últimos 10 anos devido a condições climáticas adversas (Fundecitrus, 2019).

O cenário da citricultura atual é muito diferente do passado. No estado de SP o setor está concentrado em médios e grandes produtores. O que começou com pomares pequenos e familiares, hoje perde em competitividade para os grandes produtores em virtude da mecanização e profissionalização dos pomares, crescimento de pomares destinados à indústria de suco, bem como o alto custo de produção devido a elevada incidência de pragas e doenças (Fundecitrus, 2019).

1.2 Principais doenças bacterianas que impactam a citricultura

Podemos dizer que a citricultura brasileira é uma grande potência nacional, não só apenas pela hegemonia de sua produção, mas também por ter resistido até hoje diante das inúmeras pragas e doenças que afetam os pomares, conseguindo manter números competitivos no cenário mundial. Muitas vezes as árvores precisam ser erradicadas completamente dos pomares devido a intensa severidade da doença ou pelas medidas de controle adotadas.

O Huanglongbing (HLB) ou greening tem se tornado a doença mais destrutiva e ameaçadora da cultura de citros no mundo. Essa doença é causada pela bactéria '*Candidatus Liberibacter spp*' e tem seu desenvolvimento restrito ao floema das plantas. O psíldeo *Diaphorina citri* é o inseto vetor responsável por transmitir a doença nas Américas e na Ásia, mas na África a transmissão é feita pelo *Trioza erytrea*. Foi apenas no ano de 2004 e 2005 que a doença foi identificada no estado de São Paulo e na Flórida, respectivamente, as duas maiores regiões produtoras de citros do mundo (Coletta-Filho et al., 2004; Halbert, 2005; Bové, 2014). Além do HLB, a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico também são doenças bacterianas de grande importância econômica para a citricultura brasileira e serão destacadas adiante, uma vez que serão foco de estudo dessa tese.

1.2.1 Clorose variegada dos citros

A CVC foi pela primeira vez reportada na região noroeste do estado de São Paulo em 1987 (Bové & Ayres, 2007) e foi apenas em 1993 que o postulado de Kock foi elucidado, identificando a bactéria *Xylella fastidiosa* como agente etiológico da doença (Chang et al., 1993; Hartung et al., 1994; Schaad et al., 2004; Schuenzel et al., 2005). Verificada em todo o parque citrícola do país, a CVC constitui um problema fitossanitário que afeta todas as variedades comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis*) e pode levar a uma redução de 75% no peso do fruto, tornando-o pouco atrativo para o comércio. A incidência de CVC no cinturão citrícola chegou a atingir 50% dos pomares nos anos 2000, mas hoje é de apenas 1,3%. Atualmente, o nível de incidência baixo da doença nos pomares é em decorrência das práticas de manejo para combater o greening, porque os produtos que controlam o psíldeo nos pomares também são efetivos no controle das cigarrinhas, inseto vetor que transmite a CVC (Fundecitrus, 2019). Contudo, o grande sucesso do controle da CVC se deu pela implementação do novo sistema de produção de mudas de citros em 2003 (Carvalho, 2003). Os viveiros, que antes forneciam borbulhas e mudas produzidas em sistema aberto no campo, tiveram que se adaptar para produzir em sistema de telado e certificado. Isso permitiu o

fornecimento de mudas com certificação de sanidade para os pomares das diversas regiões produtoras (Coletta-Filho & De Souza, 2014).

O nome da doença é em alusão às pontuações cloróticas (amareladas) presentes nas folhas das plantas infectadas e por esse motivo a doença também é chamada de “amarelinho” pelos produtores. Os sintomas da CVC se iniciam em um único ramo, evoluindo por toda a copa da planta. Nas folhas maduras ocorrem pontos cloróticos distribuídos irregularmente na parte superior do limbo foliar, com a correspondente presença de uma lesão levemente convexa (marrom ou parda) na face inferior da folha, podendo evoluir em lesões necróticas. A planta infectada com a bactéria possui florescimento excessivo, o que acarreta o aumento do número de frutos com reduzido tamanho e qualidade (Figura 1) (Coletta-Filho & De Souza, 2014).



Figura 1: Sintomas característicos da CVC, manifestando-se nas folhas como pontos cloróticos na parte superior da folha, com correspondente lesão necrótica na face inferior. O desenvolvimento do fruto também é afetado, o qual permanece com tamanho reduzido.

X. fastidiosa é uma bactéria gram-negativa, que faz parte do grupo das bactérias com crescimento limitado ao xilema. Essa bactéria possui uma ampla gama de hospedeiros e é considerada patógeno em mais de 100 espécies, como por exemplo: citros, videira, ameixa, café, amêndoa e oliveiras (Rapicavoli et al., 2018). Na figura 2, podemos observar a distribuição geográfica da *X. fastidiosa* pelo mundo, espécie que é subdividida em cinco subespécies: *fastidiosa*, *pauca*, *multiplex*, *sandyi* e *moris* (Almeida & Nunney, 2015). *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* causa o “Mal de Pierce” em videiras na América do Norte e Central, assim como *X. fastidiosa* subsp. *pauca* causa CVC em citros no Brasil. Essas duas subespécies são amplamente estudadas por sua relevância na agricultura e muito do que se sabe sobre a biologia da bactéria é proveniente dos estudos envolvendo esses dois patossistemas. Até pouco tempo atrás, a *X. fastidiosa* era um patógeno limitado das Américas,

mas em 2013 foi identificada em oliveiras na Europa. A mesma subespécie que causa a CVC, também causa a “síndrome do declínio rápido das oliveiras”, responsável pela morte das oliveiras centenárias no sul da Itália (Saponari et al., 2013) e tem ganhando grande destaque no cenário mundial.

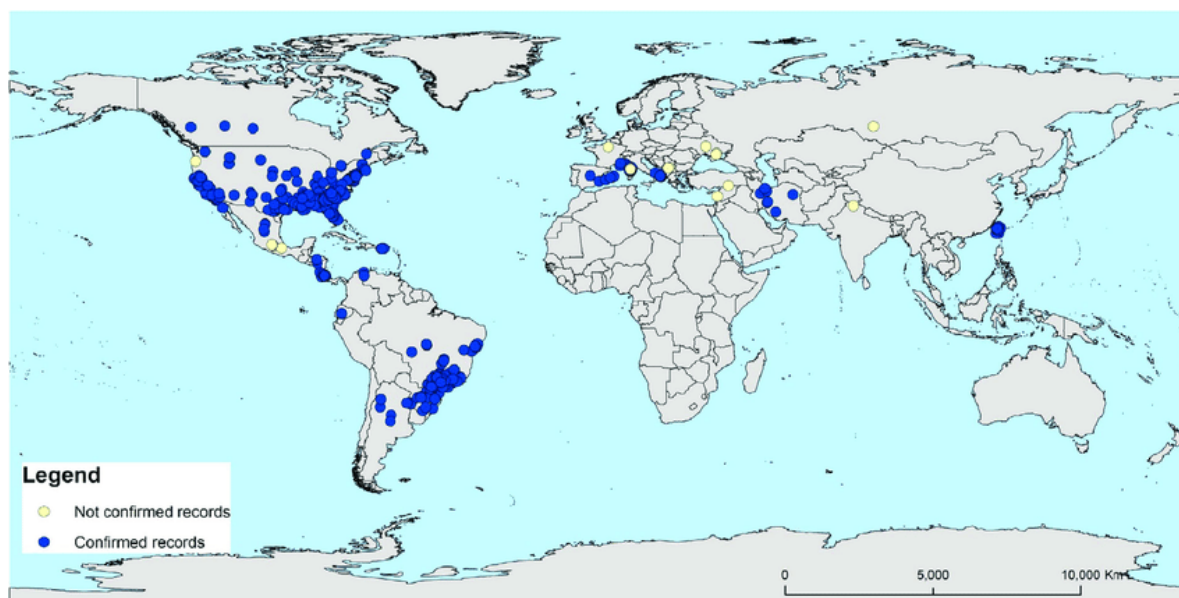


Figura 2: Mapa da distribuição geográfica da bactéria *Xylella fastidiosa* spp. (Delbianco et al., 2018).

A capacidade de formar biofilme pela bactéria é crucial para a colonização da bactéria na planta hospedeira. Nas plantas que possuem alto nível de infecção pelo patógeno é comum observar o biofilme em grande abundância, onde a bactéria encontra-se na fase adesiva, ideal para a aquisição pelo inseto vetor (Newman et al., 2003; Roper et al., 2007). Entretanto, no início da infecção é necessário que a bactéria esteja em estado exploratório e móvel para que consiga se mover sistemicamente dentro dos vasos do xilema. As vesículas de membrana externa (OMVs) são estruturas que permitem a interação de bactérias Gram-negativas com seu ambiente e podem ser encontradas a longas distancias do ponto de infecção. A produção das OMVs é uma estratégia adotada pela *X. fastidiosa* para evitar sua fixação na fase exploratória (Ionescu et al., 2014). As OMVs podem conter proteínas solúveis, fosfolipídeos, lipopolissacarídeos (LPS) e DNA, sendo que bactérias patogênicas como a *X. fastidiosa*, podem utilizar as OMVs para liberar fatores de virulência, sinais de *quorum sensing*, padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) como por exemplo a proteína EF-Tu, e outros componentes tais como adesinas (Nascimento et al., 2016).

Apesar de não apresentarem flagelo, a *X. fastidiosa* apresenta uma colonização efetiva devido a estruturas denominadas Pili Tipo IV, que constituem adesinas fimbriais com papel na motilidade tipo *swimming*, permitindo que a bactéria migre contra o fluxo do xilema (Li et al., 2007; De la Fuente et al., 2007). Ainda, para a bactéria se deslocar pelas células dos vasos xilemáticos, torna-se necessária a degradação dos compostos da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteína), o que é realizado a partir das exoenzimas produzidas pela bactéria. A degradação de membranas de pontuação (membranas *Pit*) possibilita o deslocamento das bactérias de uma célula para outra nos vasos do xilema da planta hospedeira. Dessa maneira, as bactérias conseguem se multiplicar no interior dos vasos do xilema e o crescimento em biofilme, associado à produção de gomas polissacarídicas, levam à obstrução dos vasos e prejudica o deslocamento de água e nutrientes pela planta (Niza et al., 2015; Rapicavoli et al., 2018).

Diferente de outras bactérias fitopatogênicas, *X. fastidiosa* não possui sistema de secreção do tipo III (SST3), que é responsável por secretar moléculas efetoras capazes de aumentar a virulência e/ou suprimir o sistema de defesa da planta (Dow & Daniels, 2000). Contudo, o sistema de secreção do tipo I, II, IV e V estão presentes, assim como também foram identificados fatores de virulência importantes encontrados em bactérias gram-negativas patogênicas, os quais lesam ou matam as células vegetais e favorecem a colonização do patógeno na planta hospedeira (Simpson et al., 2000; Van Sluys et al., 2003). Mais recentemente, o secretoma de *X. fastidiosa* que causa doença em videiras revelou que uma proteína secretada com função de lipase/transferas (LesA) está associada a patogenicidade da bactéria e manifestação de sintomas na planta. Essa proteína está presente em abundância nas OMVs e pode ser translocada a longas distâncias, sem a necessidade da formação de biofilme (Nascimento et al., 2016).

Todas as variedades de laranja doce são suscetíveis a CVC, mas as tangerinas (*Citrus reticulata*) e seus híbridos com *C. sinensis* são tolerantes ou resistentes à bactéria e não apresentam sintomas da doença. Apesar de ser possível isolar a *X. fastidiosa* no início da infecção, ao longo do tempo o patógeno perde a habilidade de colonizar esse hospedeiro (Coletta-Filho et al., 2007). Baseado nesses resultados, o perfil de expressão de genes diferencialmente expressos em *C. reticulata* foi analisado por técnicas de expressão gênica global, como ESTs e RNAseq (De Souza et al., 2007; 2009). Os resultados revelaram padrões diferenciais na expressão de genes relacionados à defesa, tais como os da via de sinalização do ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET), indicando que esses hormônios estão relacionados à resistência contra a bactéria. Além disso, foram identificados genes que

codificam receptores PRRs, genes envolvidos no metabolismo secundário, na biossíntese e modificação da parede celular e genes da síntese do ácido abscísico, AJ e auxina (Rodrigues et al., 2013). Os dados de expressão gênica indicam que a resposta genética da planta diante da infecção leva ao reconhecimento do patógeno inicialmente como um organismo necrotrófico. Isso acontece por meio do reconhecimento de sinais moleculares provenientes da degradação da parede celular pela *X. fastidiosa*, o que leva a indução de genes relacionados com a via de sinalização da auxina. Posteriormente, quando o biofilme da bactéria está maduro, a planta reconhece o patógeno como um organismo biotrófico, muito provavelmente através do reconhecimento de moléculas associadas ao patógeno (PAMPs) por receptores PRRs. Esse conjunto de genes diferencialmente expressos em *C. reticulata* são considerados chaves para a resistência a CVC e podem ser bons candidatos para se obter resistência em genótipos suscetíveis, tais como a laranja doce, através do melhoramento clássico ou da engenharia genética.

1.2.2 Cancro Cítrico

O cancro cítrico é uma das doenças mais antigas da citricultura, sendo endêmica da Ásia e causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A doença foi identificada no Brasil pela primeira vez no estado de São Paulo em 1957 e depois se disseminou para outras regiões produtoras do país. Diferente do HLB e da CVC, essa doença não possui inseto vetor, mas é facilmente disseminada através do vento, água e material contaminado proveniente do campo (Gottwald et al., 2002; Moreira et al., 2005; Graham et al., 2004). Os danos causados pela doença foram agravados com a introdução da larva-minadora-do-citros (*Phyllocnistis citrella*) em 1996. Os ferimentos causados pela larva nas folhas jovens facilitam a entrada da bactéria e intensificam a disseminação da doença (Prates et al., 1996).

As medidas de controle adotadas para o cancro cítrico são: utilização de mudas sadias provenientes de viveiros certificados, utilização de combinações de copa e porta-enxerto menos suscetíveis a doença, quebra-vento, aplicações de cobre nos pomares, controle da larva-minadora, uso de indutores de resistência e controle de pessoas, máquinas e equipamentos provenientes de pomares contaminados (Fundecitrus, 2019). Todas essas medidas não eliminam o patógeno do pomar, mas ajudam a diminuir a incidência do cancro cítrico nos pomares, reduzindo as perdas econômicas. Mas o sucesso do manejo de áreas endêmicas é altamente dependente de aplicações de cobre. Os compostos a base de cobre atuam de forma preventiva porque não possuem atividade curativa ou sistêmica. O cobre age diretamente no controle bacteriano e reduzem a quantidade de inóculo nos tecidos foliares,

prevenindo as infecções (Behlau et al., 2010; 2017). Apesar de sua atividade antimicrobiana, o uso contínuo e excessivo do cobre pode trazer impactos negativos ao meio ambiente e para a planta. A acumulação de cobre no solo pode afetar o crescimento da raiz e a captação de nutrientes pela planta (Alva et al., 1995; Fan et al., 2011). As aplicações de cobre também causam problemas de fitotoxidez, levando a queima dos frutos e, consequentemente, redução do preço na comercialização (Graham et al., 2008). Além disso, já foi visto o desenvolvimento de estirpes de *Xanthomonas* resistentes ao cobre, o que pode impactar diretamente no manejo efetivo da doença (Behlau et al., 2011; Richard et al., 2017; Gochez et al., 2018).

O Estado de São Paulo sempre teve uma rígida política de combate ao cancro cítrico, que é resultado de uma ação conjunta do setor citrícola e do poder público. A incidência da doença que era em torno de 0,2% na década passada, hoje é de 15% de plantas sintomáticas (Fundecitrus, 2019). Isso é resultado do afrouxamento da legislação que aconteceu a partir de 2009. Antes de 2009, os produtores eram obrigados a erradicar todos os talhões que possuíam incidência da doença acima de 0,5% e a fazer inspeções periódicas a cargo da Fundecitrus. Com a nova resolução, a obrigação era de apenas erradicar a planta contaminada e as que estivesse em um raio de 30 metros. Diante disso, foi visto o aumento considerado da incidência da doença no estado de São Paulo, principalmente nos últimos dois anos, o que dificulta manter a produção diante dos impactos causados por essa doença.

Xanthomonas é um grande gênero de bactérias Gram-negativas, que compreende 27 espécies que causam graves doenças em culturas economicamente importantes além de citros, tais como a banana, arroz, tomate, pimenta e feijão (Ryan et al., 2011). Dentre as espécies de *Xanthomonas*, há dois grupos filogeneticamente distintos que causam o cancro cítrico. A forma americana, *X. fuscans* subsp. *aurantifolii*, causa o cancro B e a forma asiática, *X. citri* subsp. *citri*, causa o cancro A e é mais comumente difundida, afetando todas as variedades de citros (Schaad et al., 2006). *X. citri* é uma bactéria aeróbica, que inicialmente cresce de forma epífita em superfícies foliares e depois entra no hospedeiro através de hidatódios, feridas ou estômatos para colonizar o mesófilo (Ryan et al., 2011).

De maneira geral, os impactos desta doença estão relacionados à desfolha de plantas, à depreciação da qualidade da produção pela presença de lesões em frutos, à redução na produção pela queda prematura de frutos e à restrição da comercialização da produção para áreas livres da doença. Os sintomas característicos da doença envolvem a formação de lesões corticosas e salientes em ambos os lados da folha, que se manifestam com uma semana a dois meses após inoculação da bactéria (Figura 2). Há indução da formação de tecido hiperplásico,

o que resulta em lesões do tipo cancro, sendo essa a sintomatologia característica e essencial para o diagnóstico da doença (Carvalho et al., 2015). O cancro cítrico afeta todas as variedades comerciais de citros, porém a severidade da doença varia de acordo com a espécie e variedade.



Figura 2: Sintomas característicos do cancro cítrico que podem estar presentes nos frutos, nas folhas e no caule em forma de lesões corticosas.

A resistência ao cancro pode ser dividida em cinco níveis: altamente resistente, resistente, pouco suscetível, suscetível e altamente suscetível (Gottwald et al., 2002; Carvalho et al., 2015). Nagami kumquat (*Fortunella margarita*) e Ponkan mandarim (*C. reticulata*) são considerados genótipos resistentes e Dunkan grapefruit (*Citrus paradise*) representa genótipo altamente suscetível. Alguns trabalhos mostram que kumquat ativa uma resposta de defesa contra *X. citri*, tornando-o altamente resistente. Essa resposta de defesa pode estar associada com mudanças fisiológicas (produção de H_2O_2), estruturais (espessamento da parede celular) ou moleculares (reprogramação da expressão gênica) (Khalaf et al., 2007). Com o sequenciamento do genoma de *X. citri* (Silva et al., 2002), foi possível verificar a presença de uma série de genes candidatos envolvidos nos mecanismos de infecção e patogenicidade dessa bactéria. Quando a bactéria entra na planta hospedeira, ela regula primeiramente os genes de patogenicidade envolvidos na motilidade e aderência. Após um período de crescimento endofítico limitado, provavelmente por uma baixa disponibilidade de nutrientes, a bactéria se adere à parede celular e usa seu sistema de secreção tipo III para ativar genes adicionais da patogenicidade, que irão secretar ou injetar efetores, incluindo proteínas Avr, Pop e Pth (Brunings e Gabriel, 2003).

1.3 Imunidade inata das plantas

As plantas possuem um sofisticado sistema imune inato que atua contra o ataque de potenciais patógenos do meio ambiente. Elas empregam receptores PRRs que estão localizados na superfície celular. Esses receptores são empregados no reconhecimento de PAMPs/MAMPs (*pathogen-associated* ou *microbe-associated molecular patterns*), bem como DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), que são moléculas derivadas do hospedeiro liberadas após dano celular. Os PRRs são divididos em receptores quinase (RKs) e proteínas do tipo receptor (RLPs). Os RKs possuem domínio extracelular, como ectodomínio variável para ligação e reconhecimento do ligante, domínio transmembrana único e domínio quinase que transduz o sinal. Os RLPs compartilham a mesma estrutura, mas não possuem a quinase. De acordo com a natureza do ectodomínio, os PRRs podem reconhecer uma ampla gama de diferentes elicitores de origem proteica, carboidratos ou lipídios (Boutrot e Zipfel, 2017).

A imunidade inata desencadeada pela interação PRR e PAMP é chamada de PTI (*PAMP-triggered immunity*) e é considerada a primeira linha de defesa contra a tentativa de infecção por um microrganismo. Por outro lado, quando um patógeno adaptado ao hospedeiro burla o sistema de reconhecimento pelos PRRs, são os receptores NLRs (*nucleotide-binding domain leucine-rich repeat proteins*) que ativam a ETI (*effector triggered immunity*). NLRs são receptores citoplasmáticos que atuam no reconhecimento de moléculas efetoras secretadas pelo patógeno dentro da célula do hospedeiro. Enquanto PAMPs são moléculas conservadas e essenciais para o desenvolvimento do patógeno, os efetores são específicos para uma ou mais espécies relacionadas (Thomma et al., 2011). PTI compreende uma variedade de respostas a nível celular para dificultar a proliferação do patógeno e a progressão da doença. Após o reconhecimento do patógeno, várias respostas de defesa são ativadas e incluem geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) e a expressão de genes relacionados à defesa. A resposta ETI geralmente está associada a morte celular programada, uma resposta que é referida como resposta de hipersensibilidade (HR) e resistência sistêmica adquirida (SAR) no hospedeiro (Boller & Felix, 2009).

Os RKs constituem uma família de receptores que possuem um papel importante em inúmeros processos biológicos. A característica do seu domínio variáveis na região extracelular N-terminal é o que determina se eles atuam no controle do crescimento, desenvolvimento, diferenciação, morfogênese, morte celular e respostas de defesa contra patógenos. Os RKs que apresentam repetições ricas em leucina (LRR)-RKs em seu domínio

extracelular são capazes de reconhecer proteína e estão diretamente relacionados ao reconhecimento de patógenos. FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2), EF-Tu RECEPTOR (EFR) e Xa21 são os PRRs mais bem estudados. Eles pertencem ao grupo XII das LRR-RKs e possuem quinase non-RD, que significa que não possuem a arginina altamente conservada (R) que precede o aspartato (D) catalítico típico da maioria das quinases (Schwessinger et al., 2012).

FLS2 é responsável por reconhecer a flagelina das bactérias em uma região conservada de 22 aminoácidos, denominada flg22 (Gómez-Gómez & Boller, 2000). EFR reconhece a proteína mais abundante das bactérias, EF-Tu e seu epítipo elf18, que faz parte da maquinaria de tradução das bactérias (Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2006). Já o receptor Xa21, está envolvido no reconhecimento do epítipo sulfatado RaX16 da proteína RaxX, produzido pelo patógeno bacteriano *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song et al., 1995; Pruitt et al., 2017); O reconhecimento da flagelina pelo receptor FLS2 é amplamente distribuído nas plantas superiores (Gómez-Gómez & Boller, 2000; Boller & Felix, 2009), mas algumas espécies da família *Solanaceae* (tomate, batata e pimenta) são capazes de reconhecer outra região da proteína, flgII28, reconhecida pelo receptor adicional FLS3 (Hind et al., 2016). Em arroz, sabe-se que outro receptor ainda desconhecido pode reconhecer a flagelina de *Acidovorax avenae* (Katsuragi et al., 2015), assim como pode reconhecer outro epítipo de EF-Tu (EFa50) independente do receptor EFR (Furukama et al., 2014). Alguns mecanismos para burlar o reconhecimento pelo hospedeiro já são descritos para *Pseudomonas* spp., que envolvem tanto a alteração de importantes regiões da flagelina (Vinatzer et al., 2014), quanto a degradação do excesso de monômeros de flagelina pela ação de uma protease secretada pela bactéria (Bardoel et al., 2011; Pel et al., 2014).

1.4 Utilização do receptor EFR para conferir resistência em amplo espectro em culturas de importância econômica

O receptor EFR é um dos PRRs mais bem estudados e caracterizados. Trabalhos prévios mostram que este receptor é expresso em *A. thaliana* e em outras espécies da família *Brassicaceae*, mas não está presente na família *Solanaceae*, o qual faz parte o tomate, tabaco e batata (Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2006). A expressão heteróloga do receptor EFR em *Nicotiana benthamiana* confere resposta ao peptídeo elf18 (região N-terminal do EF-Tu reconhecida por EFR), podendo ser confirmada pela ativação da produção de H₂O₂ e etileno (Zipfel et al., 2006). Entretanto, nesse trabalho não foi avaliado se a expressão do gene *EFR* nas plantas transgênicas conferiam resistência à doenças e se a resistência seria eficaz contra

um amplo espectro de patógenos bacterianos. Em trabalhos posteriores essas perguntas puderam ser respondidas e são descritos adiante.

Lacombe et al. (2010) mostraram que *N. benthamiana* e tomate (*Solanum lycopersicum*) exibiram considerável aumento da resistência a diversas bactérias patogênicas do gênero *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas* e *Ralstonia*. A transferência entre famílias desse receptor sugere que *N. benthamiana* e tomate possuem os componentes necessários para a sinalização mediada pelo receptor EFR. Dessa forma, essa é uma estratégia que pode ser viável em outras espécies de interesse econômico. Assim, outros trabalhos começaram a mostrar que também seria possível transferir esse mesmo receptor entre duas classes diferentes de plantas, como as monocotiledôneas. Schoonbeek et al. (2015) geraram plantas transgênicas de trigo (*Triticum aestivum*) expressando o gene *EFR* sob controle do promotor constitutivo da actina de arroz e testou sua resposta contra o peptídeo elf18. As plantas transgênicas foram capazes de reconhecer o peptídeo, conferindo maior tolerância ao patógeno bacteriano de cereais, *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae*, e reduzindo a multiplicação bacteriana e o tamanho da lesão. Lu et al. (2015) também conduziram trabalhos com monocotiledôneas. Neste caso, culturas de células e plantas transgênicas de arroz (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) foram transformadas com o gene *ERF*, sob controle do promotor constitutivo 35S. Foi demonstrado que o peptídeo efl18 derivado de *X. oryzae* induziu estresse oxidativo e ativação de MAPK em células e plantas transformadas com o receptor EFR, respectivamente. As plantas transgênicas apresentaram alta resistência a *X. oryzae*, uma das bactérias patogênicas mais importantes de arroz. Adicionalmente, também houve aumento da resistência a *A. avenae* subsp. *avenae*, outra bactéria patogênica de arroz.

Posteriormente, o gene *EFR* também foi transferido para uma variedade comercial de batata (*Solanum tuberosum*), assim como para uma linhagem melhorada de batata que foi introgridida com a resistência a murcha-bacteriana, doença causada por *R. solanacearum*. Para os dois backgrounds genéticos foi possível notar maior resistência, com diminuição do crescimento bacteriana e prevenção do fenótipo patogênico nas linhagens (Boschi et al., 2017). Ainda, o receptor EFR foi testado em outra planta modelo, *Medicago truncatula*, e foi possível notar maior resistência ao patógeno *R. solanacearum*. Em contrapartida, a presença do receptor não afetou a interação da bactéria simbiote *Sinorhizobium meliloti* com a planta em relação a formação dos nódulos radiculares e fixação de nitrogênio (Pfeilmeier et al., 2019).

1.5 Utilização de receptores PRRs para aumentar a resistência a doenças bacterianas em citros

Diante da importância dos PRRs, a transferência desses receptores entre espécies foi proposta como uma estratégia para aumentar a resistência a doenças em culturas economicamente importantes, como por exemplo, citros. Essa é uma estratégia viável, uma vez que os PAMPs são moléculas conservadas e amplamente distribuídas nos diferentes grupos de organismos, o que possibilita obter a resistência em amplo espectro. Além disso, os complexos formados pelos PRRs para ativar a resposta PTI compartilham co-receptores comuns e a rede de sinalização *downstream* são conservados até mesmo em espécies filogeneticamente distantes (Wan et al., 2019). Essa estratégia já tem sido utilizada em algumas espécies de citros para conferir resistência em amplo espectro ao cancro cítrico (Mendes et al., 2010; Li et al., 2014; Hao et al., 2015; Shi et al., 2016; Omar et al., 2018).

Apesar das espécies de citros apresentarem gene ortólogo ao FLS2, tem sido demonstrado que algumas variedades de citros são incapazes de perceber o peptídeo flg22 derivado de *X. citri* (flg22_{xcc}) ou ocorre fraca interação com a flagelina da bactéria (Shi et al., 2015). Uma vez que o receptor FLS2 de *N. benthamiana* (NbFLS2) é capaz de reconhecer flg22_{xcc}, ativando as respostas de defesa na planta (Chinchilla et al., 2006), foram obtidas variedades de Hamlin e Carrizo superexpressando o gene que codifica o receptor NbFLS2 (Hao et al., 2015). Foi demonstrado que as plantas transgênicas ativam a produção de ROS e de genes marcadores de defesa (*PR1* e *WRKY22*) em resposta ao desafio com flg22_{xcc}. Além disso, foi possível reduzir a suscetibilidade ao cancro cítrico, indicando que é possível aumentar a resistência a doença em genótipos suscetíveis de citros utilizando o receptor FLS2 de uma espécie resistente. Posteriormente, dois receptores FLS2 (FLS2-1 e FLS2-2) foram caracterizados em espécies de citros com diferentes níveis de tolerância ao cancro cítrico (Shi et al., 2016). *FmFLS2-1* e *CrFLS2-2* derivados dos genótipos resistentes Nagami kumquat de *Fortunella margarita* e Sun Chu Sha de *C. reticulata*, respectivamente, foram superexpressos no genótipo altamente suscetível ‘Dunkan’ grapefruit de *C. Paradise*. Após o desafio com *X. citri*, foi possível perceber a redução dos sintomas da doença, indicando que a utilização de receptores PRRs tem grande potencial para o desenvolvimento de plantas transgênicas de citros através da cisgenia, com o intuito de obter plantas mais resistentes.

O receptor Xa21 previamente identificado em arroz também foi utilizado para obter plantas mais resistentes a *X. citri*. Variedades transgênicas de laranja doce (Hamlin, Natal, Pera e Valência) foram desenvolvidas expressando o gene *Xa21* e apresentaram diferentes níveis de resistência. Exceto por Valência, as plantas apresentaram significativa redução da

severidade da doença 30 dias após a inoculação (Mendes et al., 2010). Usando a mesma estratégia, a variedade Anliucheng de laranja doce foi transformada com o gene *Xa21*, sob controle do promotor nativo. Houve menor severidade da doença e um dos eventos apresentou resposta de hipersensibilidade na maioria dos sítios de inoculação (Li et al., 2014). Já na tangerina Murcott, a presença desse mesmo receptor foi capaz de reduzir a população bacteriana nas plantas, assim como houve ausência de encharcamento nas lesões e as lesões hiperplásicas se desenvolveram mais lentamente em relação as plantas não transgênicas (Omar et al., 2018).

Considerando que a cultura de citros ocupa o terceiro lugar na utilização de defensivos agrícolas (Pignati et al., 2017), a utilização de receptores PRRs é uma estratégia que poderia ter impacto positivo na cadeia produtiva porque visa o controle de doenças de uma maneira mais sustentável. A introdução de variedades modificadas geneticamente abre novas possibilidades para os programas de melhoramento de citros, diante da demanda mundial por soluções duráveis, práticas e sustentáveis.

Pensando nisso, abre-se a possibilidade de utilizar o receptor EFR para conferir resistência em amplo espectro a doenças bacteriana em laranja doce, como a CVC e o cancro cítrico. Uma vez que *X. fastidiosa* e *X. citri* apresentam em grande abundância a proteína EF-Tu em seu biofilme (Silva et al., 2011; Zimaro et al., 2013), é possível que o receptor EFR seja capaz de reconhecer esse PAMP e ativar o sistema imune da planta. Ainda, para suportar nossa hipótese, Magalhães (2016) desenvolveu mutantes de *A. thaliana* sem o gene *EFR* (*efr-1*) que apresentaram maior população de *X. fastidiosa* nos vasos de xilema e maior sintomatologia (estresse e retardo no desenvolvimento) em relação as plantas WT. Isso sugere que a falta do receptor EFR não ativou o sistema PTI em *A. thaliana* e consequentemente permitiu uma maior colonização da bactéria. Adicionalmente, plantas de tabaco superexpressando o gene *EFR* foram capazes de ativar o sistema imune da planta após o desafio com o peptídeo elf18 derivado de *X. fastidiosa* e *X. citri* (elf18_{xcc} e elf18_{xf}). Baseado nesses resultados, esperamos que a utilização desse receptor para reconhecimento de *X. citri* e *X. fastidiosa* em plantas de citros pode ser uma estratégia promissora, assim como observado para outros patossistemas.

Paralelamente, análise de RNA-Seq foram capazes de identificar um gene LRR-RK (CrLRR-RK) diferencialmente expresso em *C. reticulata* após infecção com *X. fastidiosa* (Rodrigues et al., 2013). A indução desse receptor putativo foi validada por RT-qPCR em experimentos biológicos independentes e foi confirmado a superexpressão dele em *C. reticulata* quando comparado com *C. sinensis* no início da infecção por *X. fastidiosa* (dados

não publicados). Devido à importância das LRR-RKs na resposta de defesa das plantas, posteriormente foi realizada análise filogenética para identificar LRR-RKs de duas espécies de citros (Magalhães et al., 2016). Os resultados mostraram notável expansão do grupo XII das LRR-RKs em citros, sugerindo que esses receptores possuem papel de grande importância na co-evolução de respostas adaptativas entre hospedeiro e patógeno. Foram identificados 148 e 140 receptores para *C. clementina* e *C. sinensis*, respectivamente, que foram subdivididos em quinases do tipo RD e non-RD. Como esperado, o receptor putativo CrLRR-RK foi agrupado no clado dos receptores non-RD das LRR-XII, reforçando a ideia de que este receptor pode estar envolvido no reconhecimento de *X. fastidiosa* e na ativação do sistema de defesa em espécies de tangerina.

Diante do exposto acima, este trabalho propôs transferir o conhecido receptor EFR para laranja doce, visando aumentar a tolerância a patógenos bacterianos de citros. Além disso, espera-se avançar os estudos em relação ao candidato a receptor CrLRR-RK para provar sua funcionalidade como um receptor PRR capaz de reconhecer algum PAMP derivado de *X. fastidiosa*.

2. Objetivos

- Desenvolver plantas de laranja doce superexpressando o receptor EFR de *Arabidopsis* para conferir resistência em amplo espectro a bactérias patogênicas de citros.
- Realizar a caracterização *in silico* do candidato a receptor CrLRR-RK em relação ao seu ortólogo CsLRR-RK, assim como, iniciar os estudos quanto a funcionalidade de CrLRR-RK como um receptor de reconhecimento de padrões moleculares de patógenos (PRR), usando *Arabidopsis* como planta modelo e laranja doce como alvo específico visando resistência a *X. fastidiosa* e outras bactérias fitopatogênicas de citros.

3. Referências

- Almeida RPP, Nunney L. 2015.** How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? *Plant Disease* 99: 1457–1467.
- Alva AK, Graham JH, Anderson CA. 1995.** Soil pH and copper effects on young ‘Hamlin’ orange trees. *Soil Science Society of America Journal* 59: 481–487.
- Bardoel BW, van der Ent S, Pel MJC, Tommassen J, Pieterse CMJ, van Kessel KPM, van Strijp JAG. 2011.** *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathogens* 7: e1002206.

Behlau F, Amorim L, Belasque Júnior J, Bergamin Filho A, Leite Júnior RP, Graham JH, Gottwald TR. 2010. Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. *Plant Pathology* 59: 1031–1036.

Behlau F, Canteros BI, Minsavage GV, Jones JB, Graham JH. 2011. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied Environmental Microbiology* 77: 4089–4096.

Behlau F, Scandellari LHM, da Silva Junior GJ, Lanza FE. 2017. Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. *Crop Protection* 94: 185–191.

Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology* 60: 379–406.

Boutrot F, Zipfel C. 2017. Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review Phytopathology* 55: 257–286.

Boschi F, Schwartzman C, Murchio S, Ferreira V, Siri MI, Galvan GA, Smoker M, Stransfeld L, Zipfel C, Vilaró FL, Dalla-Rizza M. 2017. Enhanced bacterial wilt resistance in potato through expression of *Arabidopsis* EFR and introgression of quantitative resistance from *Solanum commersonii*. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2017.01642.

Bové JM. 2014. Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica* 42: 579–583.

Bové JM; Ayres AJ. 2007. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life* 59: 346–354.

Brunings AM, Gabriel DW. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* 4: 141–157.

Carvalho AS. 2003. Regulamentação atual da Agência de Defesa Agropecuária para a produção, estocagem, comércio, transporte e plantio de mudas cítricas no Estado de São Paulo. *Laranja* 24: 199–239.

Carvalho S, de Carvalho Nunes WM, Belasque-Júnior J, Machado MA, Croce-Filho J, Bock CH, Abdo Z. 2015. Comparison of resistance to asiatic citrus canker among different genotypes of citrus in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. *Plant Disease* 99: 207–218.

Caserta R, Takita MA, Targon ML, Rosselli-Murai LK, Souza AP, Peroni L, Stach-Machado DR, Andrade A, Labate CA, Kitajima EW, Machado MA, De Souza AA.

2010. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4250–4259.

CEPEA. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em 05 de novembro de 2019.

Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rossetti V & Bové JM. 1993. Culture and serological detection of *Xylella fastidiosa*, the xylem-limited bacterium associated with citrus variegated chlorosis disease. *Current Microbiology* **27**: 137–142.

Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T. Felix G. 2006. The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465–476.

Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu JJ, Machado MA. 2004. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“Candidatus Liberibacter asiaticus”) in Brazil. *Plant Disease* **88**: 1382.

Coletta-Filho HD, De Souza AA. 2014. Avanços no conhecimento sobre a clorose variegada dos citros: uma abordagem sobre os diferentes componentes do patossistema. *Citrus R&T*. doi: 10.5935/2236-3122.20140003.

Coletta-Filho HD, Pereira EO, De Souza AA, Takita MA, Cristofani-Yale M, Machado MA. 2007. Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange X Murcott tangor. *Plant Pathology* **56**: 661–668.

De La Fuente L, Burr TJ Hoch HC. 2007. Mutations in type I and type IV pilus biosynthetic genes affect twitching motility rates in *Xylella fastidiosa*. *Journal Bacteriology* **189**: 7507–7510.

Dow JM, Daniels MJ. 2000. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* **17**: 263–271.

Delbianco A, Czwienzek E, Pautasso M, Kozelska S, Monguidi M, Stancanelli G. 2018. A new resource for research and risk analysis: the updated European Food Safety Authority database of *Xylella* spp. host plant species. *Phytopathology*. doi:10.1094/phyto-09-18-0343a

Embrapa. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/174066/1/4942.pdf>. Acesso em 05 de novembro de 2019.

Fan J, He Z, Ma LQ, Stoffella PJ. 2011. Accumulation and availability of copper in citrus grove soils as affected by fungicide application. *Journal of Soils and Sediments* **11**: 639–648.

Fundecitros. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em 05 de novembro de 2019.

- Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che FS. 2014.** Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **27**: 113–124.
- Gochez AM, Huguet-Tapia JC, Minsavage GV, Shantaraj D, Jalan N, Strauß A, et al. 2018.** Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. *BMC Genomics* **19**:16.
- Gomez-Gomez L, Boller T. 2000.** FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011.
- Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS. 2002.** Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS. 2004.** *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* **5**: 1–15.
- Graham JH, Leite Júnior RP, Yonce HD, Myers M. 2008.** Streptomycin controls citrus canker on sweet orange in Brazil and reduces risk of copper burn on grapefruit in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **121**: 118–123.
- Halbert SE. 2005.** The discovery of huanglongbing in Florida. Proceedings Of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, Florida Citrus Mutual, Orlando 2005, H-3.
- Hao G, Pitino M, Duan Y, Stover E. 2015.** Reduced susceptibility to *Xanthomonas citri* in transgenic citrus expressing the FLS2 receptor from *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **29**: 132–142.
- Hartung JS, Beretta MJG, Bransky RH, Spisso J, Lee RF. 1994.** Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **84**: 591–597.
- Hind SR, Strickler SR, Boyle PC, Dunham DM, Bao Z, O'Doherty IM, Baccile JA, Hoki JS, Viox EG, Clarke CR, Vinatzer BA, Schroeder FC, Martin GB. 2016.** Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nature Plants* **2**: 16128.
- Ionescu M, Zaini PA, Baccari C, Tran S, da Silva AM, Lindow SE. 2014.** *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *PNAS* **111**: 3910–3918.

- Katsuragi Y, Takai R, Furukawa T, Hirai H, Morimoto T, Katayama T, Murakami T, Che FS. 2015.** CD2-1, the C-terminal region of flagellin, modulates the induction of immune responses in rice. *Molecular Plant Microbe Interactions* **28**: 648–658.
- Khalaf A, Moore GA, Jones JB, Gmitter JFG. 2007.** New insights into the resistance of Nagami kumquat to canker disease. *Physiology Molecular Plant Pathology* **71**: 240–250.
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. 2004.** The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**: 3496–3507.
- Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz B, Jones, JDG, Zipfel C. 2010.** Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology* **28**: 365–369.
- Li Y, Hao G, Galvani CD, Meng Y, Fuente L, Hoch HC, Burr TJ. 2007.** Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation, and cell-cell aggregation. *Microbiology* **53**: 719–726.
- Li D, Xiao X, Guo W. 2014.** Production of transgenic anliucheng sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with *Xa21* gene for potential canker resistance. *Journal of Integrative Agriculture* **13**: 2370–2377.
- Lu F, Wang H, Wang S, Jiang W, Shan C, Li B, Yang J, Zhang S, Sun W. 2015.** Enhancement of innate immune system in monocot rice by transferring the dicotyledonous elongation factor Tu receptor EFR. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**: 641–652.
- Magalhães DM, Scholte LLS, Silva NV, Oliveira GC, Zipfel C, Takita MA, De Souza AA. 2016.** LRR-RLK family from two *Citrus* species: genome-wide identification and evolutionary aspects. *BMC Genomics* **17**: 623.
- Magalhães, D. M.** Análise filogenética de LRR-RLKs em *Citrus* e o envolvimento do receptor EF-Tu no reconhecimento de *Xylella fastidiosa*. 2016. 156 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade de Campinas, Campinas, Sp.
- Mendes BMJ, Cardoso SC, Boscariol-Camargo RL, Cruz RB, Mourao Filho FAA, Bergamin Filho A. 2010.** Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. *Plant Pathology* **59**: 68–75.
- Moreira LM, Souza RF, Digiampietri LA, Silva AC, Setubal JC. 2005.** Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. *OMICS* **9**: 43–76.

- Nascimento R, Gouran H, Chakraborty S, Gillespie HW, Almeida-Souza HO, Tu A, et al. 2016.** The type II secreted lipase/esterase LesA is a key virulence factor required for *Xylella fastidiosa* pathogenesis in grapevines. *Sci Rep.* 2016; 6: 18598.
- Newman KL, Almeida RP, Purcell AH, Lindow SE. 2003.** Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7319–7327.
- Niza B, Coletta-Filho HD, Merfa MV, Takita MA, De Souza AA. 2015.** Differential colonization patterns of *Xylella fastidiosa* infecting citrus genotypes. *Plant Pathology*. doi: 10.1111/ppa.12381.
- Omar AA, Murata MM, El-Shamy HA, Graham JH, Grosser JW. 2018.** Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing *Xa21* from rice. *Transgenic Research*. doi:10.1007/s11248-018-0065-2.
- Pel MJ, van Dijken AJ, Bardoel BW, Seidl MF, van der Ent S, van Strijp JA, Pieterse CM. 2014.** *Pseudomonas syringae* evades host immunity by degrading flagellin monomers with alkaline protease AprA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 603–610.
- Pfeilmeier, S, George J, Morel A, Roy S, Smoker M, Stransfeld L, Downie JA, Peeters N, Malone JG, Zipfel C. 2019.** EFR in *Medicago truncatula* reduces infection by a root pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. *Plant Biotechnology Journal* **17**: 569–579.
- Pignati AW, Lima FANS, Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR, Leão LHC, Pignatti MG (2017)** Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for health surveillance. *Ciência & Saúde Coletiva* **22**: 3281–3293.
- Prates HS, Nakano O, Gravena S. 1996.** A "minadora das folhas de citros" *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856. CATI, Campinas. 3p. (Comunicado Técnico, 129).
- Pruitt RN, Joe A, Zhang W, Feng W, Stewart V, Schwessinger B, Dinneny JR, Ronald PC. 2017.** A microbially derived tyrosine-sulfated peptide mimics a plant peptide hormone. *New Phytologist* **215**: 725–736.
- Rapicavoli J, Ingel B, Blanco-Ulate B, Cantu D, Roper C. 2017.** *Xylella fastidiosa*: an examination of a re-emerging plant pathogen. *Molecular Plant Pathology* **19**: 786–800.
- Richard D, Tribot N, Boyer C, Terville M, Boyer K, Javegny S, M. Roux-Cuvelier M, Pruvost O, Moreau A, Chabirand A, Vernière C. 2017.** First report of copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A causing Asiatic citrus canker in Réunion, France. *Plant Disease* **101**: 503.

- Rodrigues CM, De Souza AA, Takita MA, Kishi LT, Machado MA. 2013.** RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. *BMC Genomics* **14**: 676.
- Rodriguez-Moreno L, Song Y, Thomma BP. 2017.** Transfer and engineering of immune receptors to improve recognition capacities in crops. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 42–49.
- Roper MC, Greve LC, Labavitch JM, Kirkpatrick B. 2007.** Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 7252–7258.
- Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Sluys MA, Bogdanove AJ, Dow JM. 2011.** Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Review* **9**: 344–355.
- Saponari M, Boscia D, Nigro F, Martelli GP. 2013.** Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). Disease Note. *Journal of Plant Pathology* **94**: 688.
- Schoonbeek H, Wang HH, Stefanato FL, Craze M, Bowden S, Wallington E, Zipfel C, Ridout CJ. 2015.** *Arabidopsis* EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytologist* **206**: 606–613.
- Schwessinger B, Ronald PC. 2012.** Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 451–82.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Fatmi MB, Chang CJ. 2004.** *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp *piercei*, subsp nov., *X. fastidiosa* subsp *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp *pauca* subsp nov. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 290–300.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Scheler A, Agarkova I, Stromber PE, Vidaver AK. 2006.** Emended classification of *Xanthomonas* pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 590–695.
- Schuenzel EL, Scally M, Stouthamer R, Nunney L. 2005.** A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3832–3839.
- Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA. 2015.** Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, **16**: 507–520.

- Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA. 2016.** A survey of *FLS2* genes from multiple citrus species identifies candidates for enhancing disease resistance to *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *Horticulture Research* **3**: 80.
- Silva ACR, Ferro JÁ, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, et al. 2002.** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459–463.
- Silva MS, De Souza AA, Takita MA, Labate CA, Machado MA. 2011.** Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*. *Proteome Science* **9**: 58.
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, et al. 1995.** A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**: 1804–1806.
- Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, et al. 2000.** The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **406**: 151–157.
- De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Campos MA, Teixeira JEC, Targon MLPN, Carlos EF, Ravasi JR, Fischer CN, Machado MA. 2007.** Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetic Molecular Biology* **30**: 965–971.
- De Souza AA, Takita MA, Amaral AM, Coletta-Filho HD, Machado MA. 2009.** Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent de citrus variegated chlorosis. *Tree and Forestry Science Biotechnology* **2**: 957–964.
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHJ. 2011.** Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell* **23**: 4–15.
- USDA.** Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em 05 de novembro de 2019.
- Van Sluys MA, de Oliveira MC, Monteiro-Vitorello CB, Miyaki CY, Furlan LR. 2003.** Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce’s disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *Journal Bacteriology* **185**: 1018–1026.
- Vinatzter BA, Monteil CL, Clarke CR. 2014.** Harnessing population genomics to understand how bacterial pathogens emerge, adapt to crop hosts, and disseminate. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 19–43.
- Wan WL, Fröhlich K, Pruitt RN, Nürnberger T, Zhang L. 2019.** Plant cell surface immune receptor complex signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 18–28.
- Zimaro T, Thomas L, Marondedze C, Garavaglia BS, Gehring C, Ottado J, Gottig N. 2013.** Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. *BMC Microbiology* **13**: 186.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* 125: 749–760.

CAPÍTULO I: The *Arabidopsis* EFR receptor can recognize citrus bacterial pathogens and confer resistance in transgenic sweet orange

Letícia Kuster Mitre^{1,2}, Natália Sousa Teixeira-Silva¹, Cyril Zipfel^{3,4} and Alessandra Alves de Souza¹

¹Centro de Citricultura Sylvio Moreira – IAC, Cordeirópolis, SP, Brazil; ²University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ³Institute of Plant and Microbial Biology and Zürich-Basel Plant Science Center, University of Zürich, Zürich, Switzerland; ⁴The Sainsbury Laboratory, University of East Anglia, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom;

Author for correspondence:

Alessandra Alves de Souza

Tel: +55 19 35461399

E-mail: desouza@ccsm.br

Key words: pathogen-associated molecular pattern (PAMP); receptor kinase; citrus canker; citrus variegated chlorosis (CVC); bacterial pathogens; transgenic citrus, elf peptides, broad-spectrum.

Summary

Plants employ cell surface receptors to recognize pathogen (or microbe)-associated molecular patterns (PAMPs/MAMPs), which are crucial for immune system activation. The well-studied elongation factor Tu receptor (EFR) is responsible to recognize the widely conserved bacterial PAMP EF-Tu and its derived peptide elf18. The interfamily transference of the EFR receptor revealed the possibility to increase crop disease resistance in species such as tomato, rice, wheat and potato. Here, we developed sweet orange (*Citrus sinensis*) varieties expressing *EFR* to confer broad-spectrum resistance, focused on the two important citrus bacterial diseases citrus canker and citrus variegated chlorosis (CVC). A quick oxidative burst was detected in leaf discs from EFR transgenic lines when elf18_{Xcc} and elf26_{Xf} derived peptides from *Xanthomonas citri* and *Xylella fastidiosa* were challenged, indicating that the EFR receptor was able to sense elf peptides from citrus bacterial pathogens. MAPK activation and induction of defense marker genes reinforce the improved immune response of EFR citrus plants, which was confirmed due their increased resistance to citrus canker and CVC in some transgenic lines. Our results show that EF-Tu-EFR

perception system was also able to trigger plant immune response in a perennial crop, opening perspectives to get durable broad-spectrum disease resistance in field conditions.

Introduction

Plants evolved a sophisticated and highly efficient immune system as a protective mechanism against potential pathogens from the environment. Receptor kinases (RK) and receptor like proteins (RLP) anchored to the cell surface function as pattern recognition receptors (PRRs). These receptors act in the recognition of pathogen/microbe/damage-associated molecular patterns (PAMPS/MAMPs/DAMPs; hereafter PAMP) which is the initial event to activate the PAMP-triggered immunity (PTI) (Wan et al., 2019). RKs are composed of an extracellular ligand-binding domain, a single-pass transmembrane domain and a cytoplasmic kinase domain, whereas RLP shares the same basic structure but lack the kinase, therefore needing an intracellular RK to transduce the signal (Boutrot & Zipfel, 2017).

PRRs can recognize a large number of PAMPs (proteins, carbohydrates or lipids) that are generally conserved molecules essential for microbe survival (Boutrot & Zipfel, 2017). After pathogen recognition, several defense responses are activated to prevent pathogen development and disease establishment, including production of reactive oxygen species (ROS), callose deposition, activation of Ca^{2+} -dependent protein kinase and mitogen-activated protein kinase (MAPK) and induction of immune-related genes (Zipfel & Oldroyd, 2017).

The leucine-rich repeat (LRR)-RK family from the LRR-XII group is commonly associated with protein recognition. The three most well-studied receptors that confer resistance to bacterial pathogens are FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2), EF-Tu RECEPTOR (EFR) and XA21. FLS2 recognizes the epitope flg22 from bacterial flagellin and is present in all higher plants (Gómez-Gómez & Boller, 2000; Boller & Felix, 2009). More recently it has been reported that some species have developed an additional receptor for flagellin recognition. The FLS3 receptor present in *Solanaceae* plants recognizes the flagellin flgII-28 epitope (Hind et al., 2016) and a yet unknown receptor can perceive *Acidovorax avenae* flagellin in rice (Katsuragi et al., 2015). Different from FLS2, the EFR receptor is restricted to *Brassicaceae* family and is responsible to sense the widely produced bacterial EF-tu protein (or its derived peptide, elf18) (Kunze et al., 2004; Zipfel et al., 2006). However, an alternative central EF-Tu fragment (termed Efa50) can be recognized in rice and trigger immunity in a similar manner (Furukama et al., 2014). Xa21 is a rice receptor in which the tyrosine-sulfated

RaxX16 epitope was reported to be the Xa21 ligand (Song et al., 1995; Wang et al., 1996; Pruitt et al., 2015; 2017).

PRRs have been effectively transferred to several species attempting to confer broad-spectrum disease resistance in crops, demonstrating that the downstream signaling networks are widely conserved even among phylogenetically distant species (Rodrigues-Moreno et al., 2017). Particularly, the EFR receptor from *Arabidopsis thaliana* was reported to conferred resistance in *Nicotiana benthamiana* and tomato against phytopathogens from different genera (Lacombe et al., 2010). Rice plants overexpressing *EFR* also showed increased resistance against two pathogenic bacteria, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* (Holton et al., 2015; Lu et al., 2015; Schwessinger et al., 2015). Transgenic EFR-expressing wheat demonstrated enhanced resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* (Schoonbeek et al., 2015) and more recently, potato and *Medicago truncatula* showed greater resistance to *Ralstonia solanacearum* (Boschi et al., 2017; Pfeilmeier et al., 2019).

Bacterial diseases have been associated with major economic losses in commercial citrus orchards. Especially Brazil, the biggest sweet orange producer, faces serious problems to control such diseases and maintain the productivity of orchards (Bové & Aires, 2007). Huanglongbing (HLB), citrus canker and citrus variegated chlorosis (CVC), caused by *Candidatus Liberibacter* ssp., *X. citri* subsp. *citri* and *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*, respectively, are the main bacterial diseases and the most studied due to large impact in citrus agribusiness (Mendonça et al., 2017; Caserta et al., 2019). All commercial varieties of sweet orange are susceptible to these diseases and thus genetic engineering is a good strategy to support breeding programs to increase resistance. Since EF-Tu is present in the biofilm of both bacteria (Silva et al., 2011; Zimaro et al., 2013), the use of the PRR receptor EFR to provide broad-spectrum resistance in citrus plants shows great potential. In a similar strategy, the FLS2 and Xa21 receptors were previously used to increase citrus canker resistance and showed reduced symptoms in citrus species (Mendes et al., 2010; Li et al., 2014; Hao et al., 2015; Shi et al., 2016; Omar et al., 2018).

Here, we developed transgenic sweet orange expressing *EFR*. Plants were able to sense elf peptides from *X. citri* and *X. fastidiosa*, displaying rapid activation of ROS production, induction of defense genes and accumulation of MAPK. This activation and signaling of the citrus immune system culminated in a gradual increase of resistance to citrus canker and CVC, as well as better control of the bacterial population within the plant tissues.

This strategy provides engineered plants with durable PRR-based resistance against disease caused by bacteria and may support future needs of citrus breeding programs.

Material and Methods

Genetic transformation

The binary vector containing the *EFR* gene from *A. thaliana* was synthesized by the *DNA Cloning Service e. K.*. The transgene is under control of figwort mosaic virus (FMV) promoter and the *Agrobacterium* nopaline synthase (NOS) terminator. The vector carries kanamycin resistance on the T-DNA, streptomycin/spectinomycin-resistance for bacterial selection and *gus* reporter gene. The *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 was transformed by heat-shock and cells were selected on YEP medium containing streptomycin (100 mg L⁻¹) and rifampicin (50 mg L⁻¹). Transformed cells were confirmed by PCR and used for citrus transformation.

Seeds were sampled from mature fruits of Hamlin and Valencia sweet orange and cultured in MS/2 solid medium for four weeks in the dark at 27°C. Seedlings of about 15 cm in length were transferred to a 16h photoperiod for 15 days and later used as explant for genetic transformation. Epicotyl segments (0.8-1.0 cm) were excised and kept on liquid MS medium supplemented with indole acetic acid (100 mg L⁻¹) before incubation in *Agrobacterium* suspension (10⁸ CFU ml⁻¹) for 5 minutes. Dried explants were transferred to solid MS co-culture medium supplemented with sucrose (30 g L⁻¹), benzylaminopurine (BAP) (10 mg L⁻¹) and myo-inositol (100 mg L⁻¹) for three days (24°C, in the dark). After the co-culture period, the explants were transferred to solid MS medium containing kanamycin (100 mg L⁻¹) and cefotaxime (250 mg L⁻¹) for four weeks (28°C, in the dark) and then transferred to 16h photoperiod.

Molecular analysis of transformed plants

Kanamycin-resistant shoots were excised from the explants and incubated in X-Gluc solution (37°C, overnight) for β -glucuronidase assay (GUS). For the transgene sequence detection, genomic DNA was extracted from leaves using the CTAB method (Doyle & Doyle, 1990) and PCR was performed with the forward primers annealing to the FMV promoter (5'-TGGCTTGTGGGGACCAGAC-3') and the reverse primer within the *EFR* sequence (5'-GAAGCTCACCTCCAAGTCTA-3'). The well-developed and PCR positive shoots grown *in vitro* were grafted directly on Rangpur lime (*Citrus limonia*) rootstocks and kept under greenhouse conditions. Source plants were used to produce clones for subsequent

evaluation. Transformation efficiency was calculated as the percentage of GUS-positive shoots in the total of explants exposed to *Agrobacterium* culture.

Gene expression analysis by RT-qPCR

Total RNA was extracted from leaves of transgenic and non-transgenic plants using RNeasy Mini Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen) and treated with RNase free-DNase (Promega). RNA quality and concentration were assessed by gel electrophoresis and spectrophotometer (NanoDrop 8000 - Thermo Scientific). cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The relative expression values were analyzed using the SYBR Prime Script RT-PCR kit (Thermo Scientific) in ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems) and were determined by $\Delta\Delta C_t$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Expression values were normalized by the endogen cyclophilin. The following primers were used: EFR, 5'-TGGCTGCAGCTAGAAGATCTGG-3' and 5'-TGGCTGCAGCTAGAAGATCTGG-3'; CYCLOPHILIN, 5'-AGAGTATGCAGAGGAATGG-3' and 5'-GTCCTTAACAGAAGTCCGT-3'; WRKY23, 5'-CTCCCAACTCATCCTCAATCTC-3' and 5'-CTGCTGCTGTTGTTGTTGTT-3'; SGT1, 5'-AGGATGTTGAGACAGTGATGG-3' and 5'-CTTCCTCAGGCTTCTGGTAAA-3'; NPR2, 5'-TCCTAGGATGGAAGCCCTTAT-3' and 5'-GGTCGTCCTCCATGAACCTTATC-3'; EDS1, 5'-GGCTCGAGTATGCCCTGAAG-3' and 5'-CTTGCCCAGAAACATGATTCC-3'.

ROS production assay

Leaf discs (0.5 cm) from young tender leaves were displaced on autoclaved water overnight in a 96-well plate at room temperature and then challenged by 100 µl of elicitation solution (17 mM luminol, 1 µM horseradish peroxidase and 100 nM elf18_{Ec} or 10 µM elf18_{Xcc}/elf18_{Xf}). Luminescence was immediately measured over a period of 40 minutes using Varioskan Flash Multiplate Reader (Thermo Scientific). The peptides elf18_{Ec} (ac-SKEKFERTKPHVNVGTIG), elf18_{Xcc} (ac-AKAKFERTKPHVNVGTIG) and elf26_{Xf} (ac-AQDKFKRTLHVNVGTIGHVDHGKTT) from *Escherichia coli*, *X. citri* and *X. fastidiosa*, respectively, were synthesized by Aminotech Research and Development.

MAP kinase assay

Leaf discs were treated with elf peptides or water for 0, 30 and 45 minutes and immediately frozen in liquid nitrogen. The samples were ground into powder before the addition of extraction buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 15 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 1 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄·2H₂O, 0.5 mM NaVO₃, 30 mM β-glycerophosphate, 0.1% IGEPAL CA 630, 100 nM calyculin A (CST), 0.5 mM PMSF, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma, P9599) and 5% glycerol]. The extracts were centrifuged at 16,000 xg and 5x SDS loading buffer added. 30 µg of total protein was separated by 12% SDS-PAGE and blotted onto PVDF membrane (Biorad). Immunoblots were blocked in 5% (w/v) BSA (Sigma) in TBS-Tween (0.1%) for 1 hour. The activated MAP kinases were detected using anti-p42/44 MAPK primary antibody (1:2500, Cell Signaling Technology, 4370) overnight at 4°C, followed by anti-rabbit-HRP conjugated secondary antibodies (Sigma).

Evaluation of citrus canker resistance

X. citri subsp. *citri* (306 stain) expressing GFP (Rigano et al. 2007) was grown overnight in liquid NBY medium containing ampicillin (100 mg L⁻¹) and gentamicin (5 mg L⁻¹). Bacterial suspension (10⁴ CFU ml⁻¹) was prepared in 1x phosphate-buffered saline (PBS) and infiltrated in three regions of transgenic and non-transgenic detached leaves. Citrus canker symptoms were evaluated 7 and 14 days after inoculation (dai). Leaf discs adjacent to the infiltration point were excised for bacterial population calculation from three independent leaves. This experiment was repeated three times and statistically significant differences were calculated using Student's *t*-test with *P*<0.05.

Evaluation of *X. fastidiosa* behavior in transgenic plants

X. fastidiosa subsp. *pauca* (9a5c stain) was cultivated in solid periwinkle gelrite (PWG) medium for 7 days (28°C). Bacterial suspension (10⁸ CFU ml⁻¹) was prepared in 1x PBS buffer for petiole inoculation on the first leaf of the transgenic and WT plants. One month after inoculation, genomic DNA was extracted from petioles of the first leaf above the inoculation point. The bacterial detection was performed by PCR using RST31/33 primers (Minsavage et al., 2010). The bacterial growth was evaluated 18 months after inoculation by qPCR in ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems). Petioles were collected in two different parts of the plants for total DNA extraction, at 5 and 30 cm above inoculation point (aip). The detection was performed using TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems) using primers CVC-1 (5'-AGATGAAAACAATCATGCAAA-3')/ CCSM-1 (5'-

GCGCATGCCAAGTCCATATTT-3') and probe TAQCVC(5'-(6FAM)AACCGCAGCAGAAGCCGCTCATC(TAMRA)p-3') and bacterial population was calculated according to the standard curve developed for *X. fastidiosa* (Oliveira et al. 2002). Infected plants were assessed for the disease severity, scored by three evaluators using a diagrammatic scale (Amorim et al., 1993; Muranaka et al., 2013) and an image panel developed by Caserta et al., (2017). All statistical analyzes were performed using Tukey's test ($P < 0.05$).

Results

Development of transgenic sweet orange expressing EFR gene

Ten independent transgenic lines of Hamlin (H1) and Valencia (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 and V9) sweet orange were successfully transformed to overexpress *EFR* from *A. thaliana*. Transgenic lines were first selected in tissue culture via kanamycin selection and histochemical GUS assay (Fig. 1a; Table S1). Transgene integration and expression profile were confirmed in all lines by PCR and RT-qPCR, respectively (Fig 1b,c). The relative transcriptional level varied among all the transgenic lines, with the V4 line showing the highest expression level, while V7 showed the lowest. Phenotypic abnormalities were absent for all transgenic lines after grafting in Rangpur lime rootstocks, except V6 line, that showed compromised leaf morphology and vegetative development (data not shown).

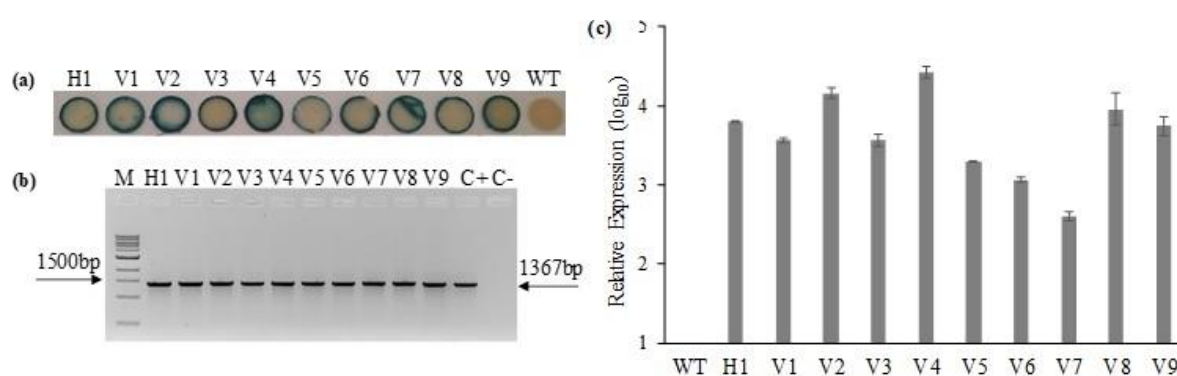


Fig. 1 Molecular confirmation of EFR-expressing transgenic citrus plants. (a) Histochemical GUS assay of transgenic lines and wild-type (WT). (b) Analysis of the PCR product (1367 bp) in agarose gel 1% depicting the presence of the transgene in Hamlin (H1) and Valencia (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8 and V9) transgenic citrus lines. (c) Relative expression level of *EFR* measured by RT-qPCR normalized to the expression of cyclophilin. Fold change is relative to the lower *EFR* expression obtained (V7 line). Bars are mean values $\pm$ standard error (SE) of three technical replicates.

EFR citrus plants confers responsiveness to citrus bacterial pathogens

To confirm whether EFR is functional in citrus, all independent lines were challenged with elf18_{Ec}. Leaf discs produced ROS burst after treatment with 100 nM of the peptide in all transgenic lines (Fig. 2a). The accumulation of ROS peaked 9 minutes after challenging and the lines produced different amounts of total ROS (Figs 2a, 3b). The recognition of elf18_{Ec} indicates the functional conservation of intracellular components to activate PTI in sweet orange.

It is known that there are differences in the amino acid sequence of elf18_{Ec} compared to elf peptides from citrus bacterial pathogens (Kunze et al., 2004; Lacombe et al., 2010). The elf18_{Xcc} and elf18_{Xf} sequences carry two and five amino acid substitutions, respectively (Fig. 3g). Interestingly, one of the amino acids substituted in elf18_{Xf} is a key residue required for full activity of elf18_{Ec} (Kunze et al., 2004). To verify if such difference is enough to prevent EFR perception the ability of the EFR ectodomain in recognizing these alternative peptides was evaluated. Both peptides only produced detectable levels of ROS in higher concentrations (10 μ M) (Figs 2b, 3a). Under these conditions all transgenic lines sensed elf18_{Xcc} (Fig. 2b) and the ROS burst occurred with the peak around 2 to 5 minutes later than elf18_{Ec} in H1, V4 and V5 lines (Fig. 3c). Although there is a decrease of elf18_{Xcc} activity, the ROS peaks are comparable to what is observed for elf18_{Ec}. We did not detect ROS production for elf18_{Xf} peptide (Fig. 3a), however, when a longer version with 26 residues (elf26_{Xf}) (Kunze et al., 2004) were used a delayed ROS production was observed peaked around 15 minutes (Figs 2c, 3d). The lower elf26_{Xf} activity is evident when compared to the peaks obtained from both elf18_{Ec} and elf18_{Xcc}. Surprisingly, even after massive protocol adjustments ROS production were only detected for H1, V4 and V5 lines (Fig 3d), the same lines showing better responsiveness to elf18_{Ec} and elf18_{Xcc} challenge. Given the data above, these events were selected for further evaluation. The insensitivity of WT plants to the elf18_{Ec}, elf18_{Xcc}, and elf26_{Xf} is indicative of the absence of an endogenous receptor for these peptides (Fig. 2a,b,c).

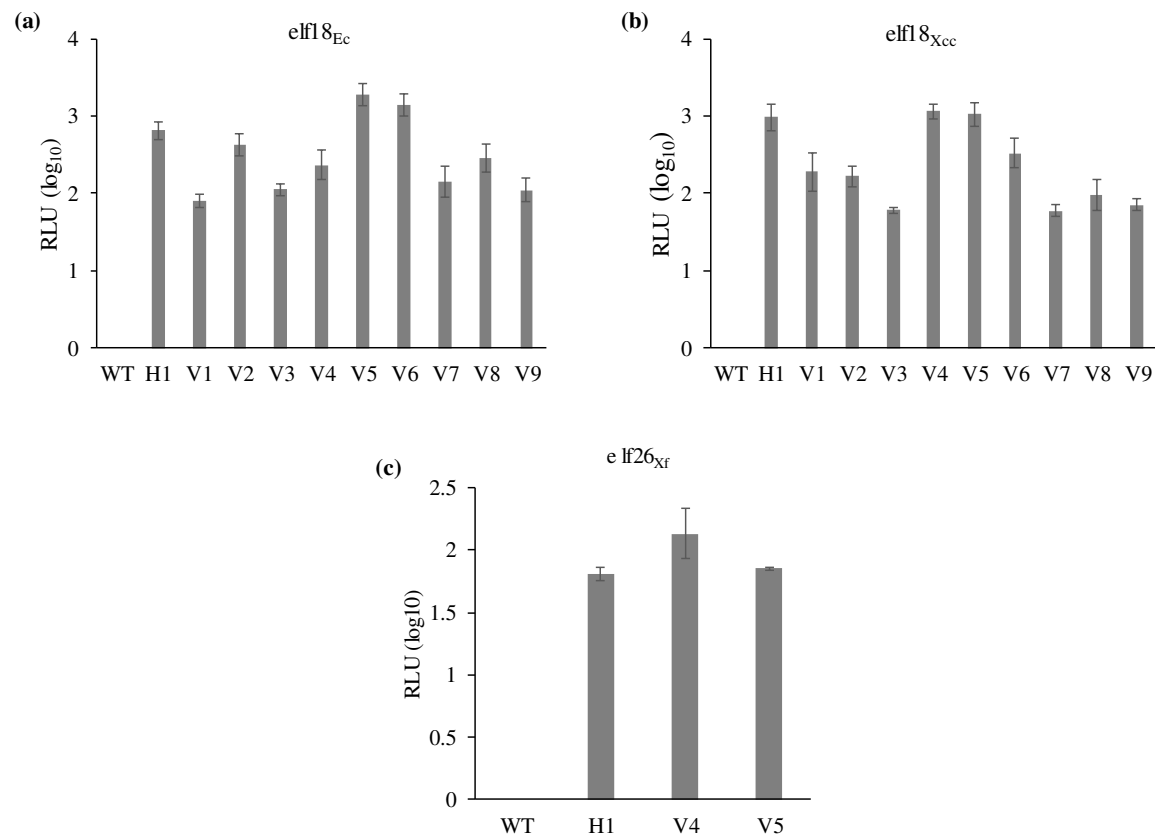


Fig. 2 The perception of elf peptides in EFR transgenic citrus plants. ROS production measured by a luminol-based chemiluminescence assay occurring after treatment with 100 nM of elf18_{Ec} (a), 10 μ M of elf18_{Xcc} (b) or 10 μ M elf26_{Xf} (c). RLU: relative unit of light. Values are means $\pm$ standard error (SE).

To better understand the differences observed in the perception of elf18_{Xcc} and elf26_{Xf}, we compared the results of the ROS assay obtained for citrus to what is known for *A. thaliana*. *Arabidopsis* Col-0 plants challenged with 100 nM of each peptide displayed ROS production for all treatments (Fig. 3e). However, the ROS peak produced by elf26_{Xf} was also delayed and significantly lower in *Arabidopsis* than the ones observed for elf18_{Ec} and elf18_{Xcc} (Fig. 3e,f). Such differences are probably due to the five amino acid substitutions compared to the elf18_{Ec} (Fig. 3g). The need for a higher concentration of peptide to obtain ROS production in citrus, suggests that the activation of the immune system in citrus is more complex than *Arabidopsis*, probably due to inherent traits from the citrus plant.

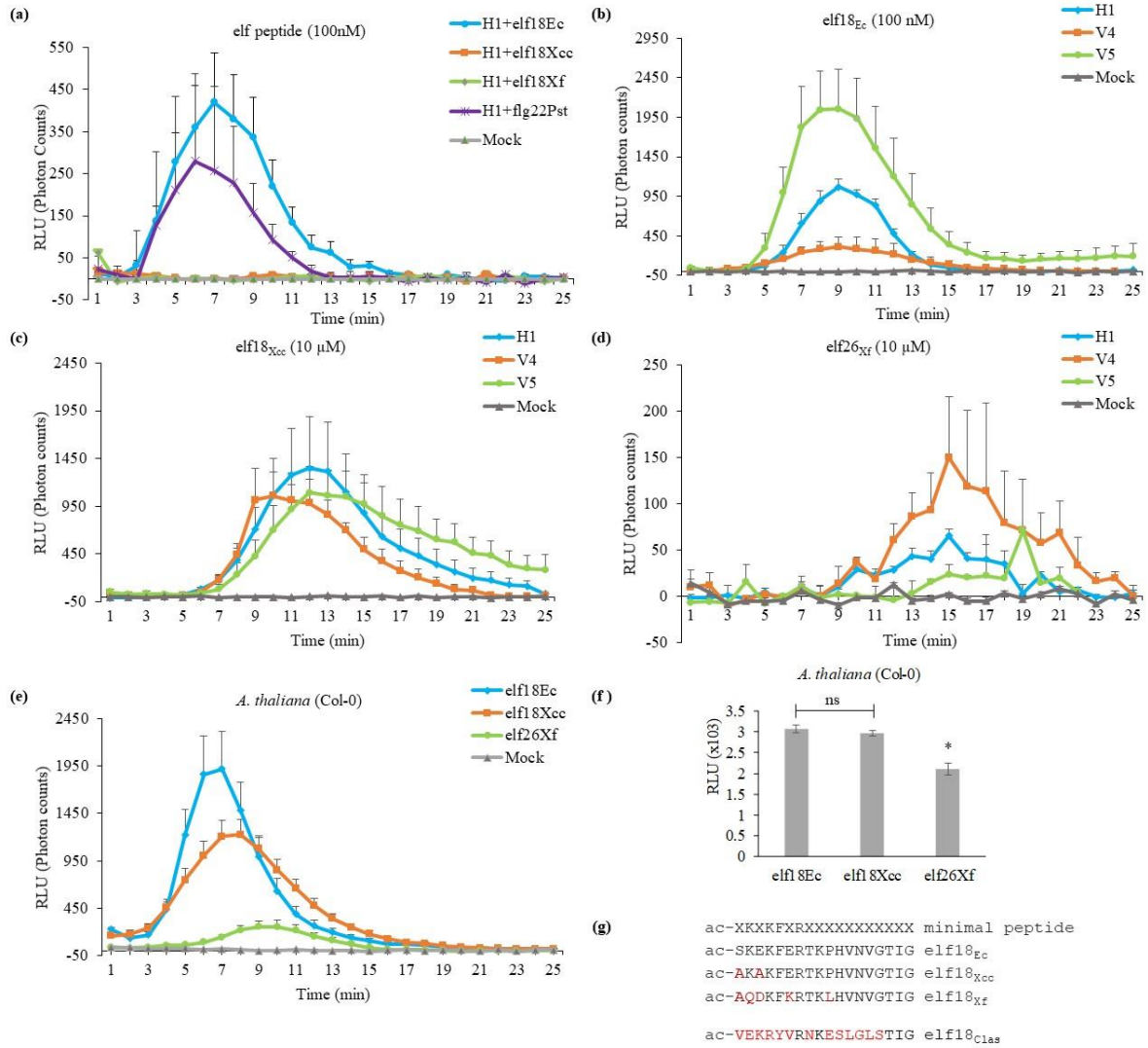


Fig. 3 The perception of elf peptides in EFR citrus lines and *A. thaliana* (Col-0) measured by luminol-based chemiluminescence assay. (a) Representative line (H1) showing that citrus transgenic lines lack responsiveness using the sub-nanomolar concentration (100 nM) of elf18_{Xcc} and elf26_{Xf}, but not with elf18_{Ec} and flg22_{Pst}, used as control. H1, V4 and V5 transgenic lines showed ROS production after treatment with 100 nM of elf18_{Ec} (b), 10 μM of elf18_{Xcc} (c) or 10 μM of elf26_{Xf} (d). (e) *A. thaliana* (Col-0) is able to sense elf peptides using the sub-nanomolar peptide concentration (100 nM). (f) Statistical analyses between oxidative burst triggered by 100 nM of elf peptides in *A. thaliana*, where asterisk indicate statistical significance of elf26_{Xf} compared to elf18_{Ec} and elf18_{Xcc} (Student's t-test) and ns is not significant at $p < 0.05$. (g) Alignment of the elf18 sequences of EF-Tu from *E. coli*, *X. citri* and *X. fastidiosa* compared with the minimal peptide (where X is any amino acid) required for full elicitation. RLU: relative unit of light. Values are means $\pm$ standard error (SE).

elf peptides activate MAPK and defense-related genes in EFR citrus plants

The expression profile of the MAPK activation and defense-related genes were measured after PAMP treatment of leaf discs in two transgenic citrus lines from Valencia and their respective WT.

Since MAPK activation occurs within minutes after pathogen perception by PRRs, we evaluated the accumulation of phosphorylated MAPK 30 and 45 minutes after elf treatment (Fig. 4). MAPK phosphorylation was detected in both transgenic lines (V4 and V5) in relation to mock treatment. MAPK activation showed to be stronger 45 minutes after PAMP treatments. A constitutive activation for V5 line without PAMP treatment was observed, but regardless, MAPK accumulation increased after treatment with the peptides.

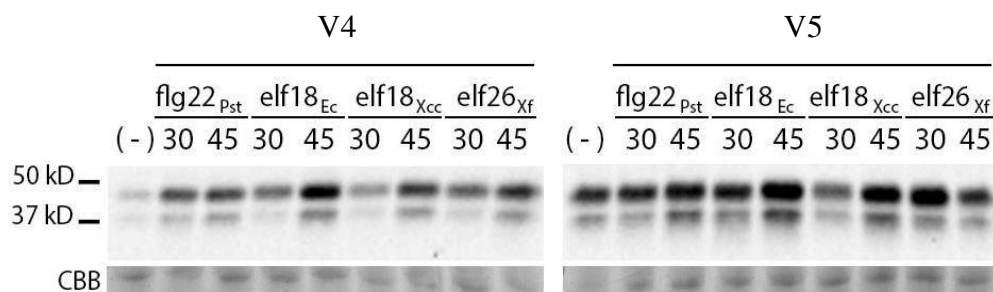


Fig. 4 MAPK activation in transgenic sweet orange (V4 and V5) after treatment with elf peptides. The leaves were treated with 100 nM of elf18_{Ec}, 10 μ M of elf18_{Xcc}, 10 μ M of elf26_{Xf} and water (-) and collected 30 and 45 minutes after treatment. As a positive control, 100 nM of flg22 from *Pseudomonas syringae* (flg22_{Pts}) was used in plant challenge. The protein accumulation was detected by western blotting using anti-phospho p44-p42-antibody (top panel). Even loading is demonstrated by Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining (lower panel).

To verify if the activation of PTI was indeed more efficient in EFR citrus lines four genes previously described as being associated with responses to biotic stress in other species and involved in the citrus defense mechanism were selected (Rodrigues et al., 2013; Schoonbeek et al., 2015; Shi et al., 2015). Leaf tissue challenged for 3 hours with elf peptides or water (mock) was collected for gene expression analysis. All genes were induced by elf peptides at different levels in V4 and V5 transgenic lines compared to mock treatment (Figs 5a-d). Notably, the upregulation of the gene expression in response to all PAMPs was stronger in V5 than in V4 line. In addition, a more induction of defense genes was obtained

after elf18_{Ec} and $\text{elf18}_{\text{Xcc}}$ in comparison to elf26_{Xf} treatment. These data corroborate the results obtained for ROS assay

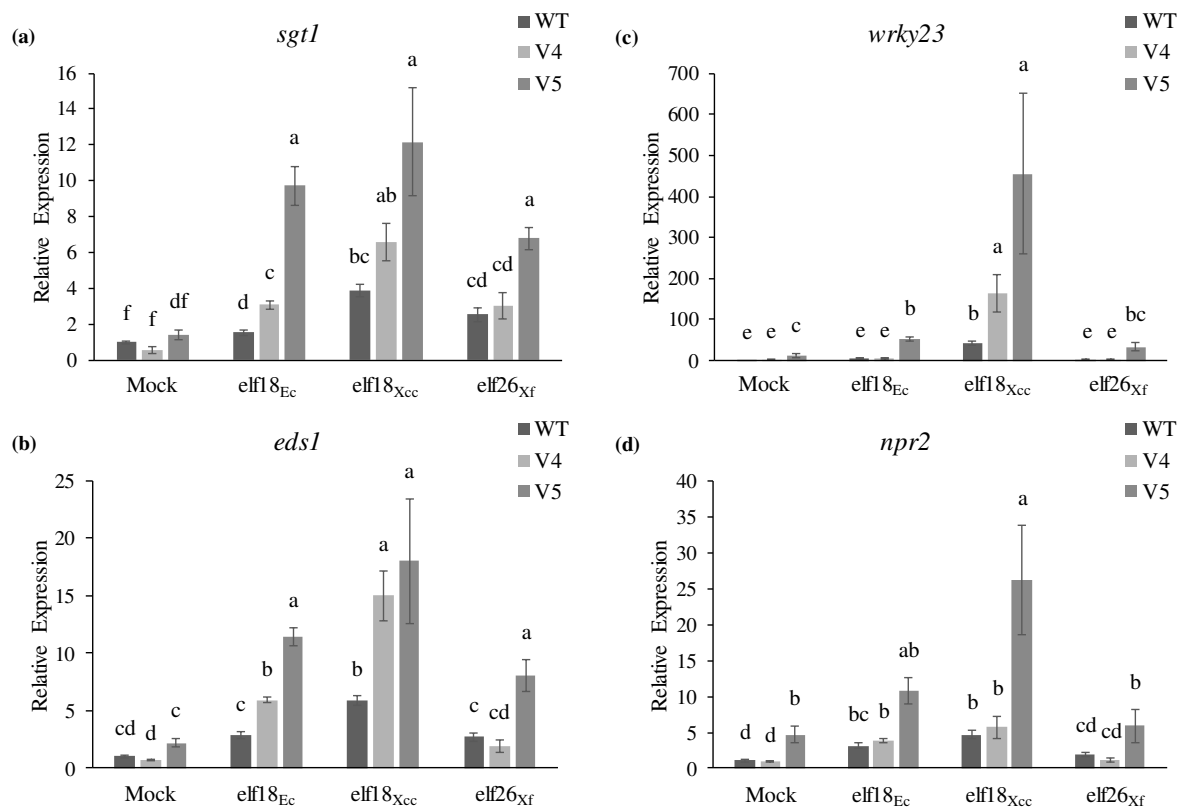


Fig. 5 Defense-related gene expression in EFR transgenic lines (V4 and V5). Four genes (*sgt1*, *wrky23*, *eds1* and *npr2*) were evaluated 3 hours after treatment with 100 nM of elf18_{Ec} , 10 μM of $\text{elf18}_{\text{Xcc}}$, 10 μM of elf26_{Xf} and water (mock). Relative gene expression levels were measured by RT-qPCR and normalized to the expression of cyclophilin. Fold change is relative to the mock treatment. Bars are mean values $\pm$ standard error (SE) of three biological replicates.

Transgenic sweet orange expressing *EFR* shows increased resistance to citrus canker

Since our results showed that transgenic sweet orange expressing *EFR* can recognize $\text{elf18}_{\text{Xcc}}$ and activate the immune system, we evaluated citrus canker resistance in Valencia transgenic lines (V1, V4 and V5). Detached leaves were infiltrated with bacterial suspension of *X. citri*_GFP and disease evolution was assessed 7 and 14 days after infiltration (dai). At 7 dai, the WT and transgenic plants did not show symptoms of canker (data not shown) and the bacterial growth were not significantly different among the treatments (Fig 5b). The typical canker lesion developed in the control and in transgenic plants 14 dai. However, the

transgenic lines showed less severity of the symptoms compared with the WT (Fig 5a). The V5 line showed less hyperplastic lesions and had no water-soaked symptoms after 14 days. In addition, no petiole abscission, an indicative of advanced symptom of the disease (Taylor & Whitelaw, 2001), was observed for this line (Fig. 5a). Additionally, bacterial population in the infiltrated region support the results described above since the bacterial growth in the V5 line was significantly lower compared to WT (Fig. 5b).

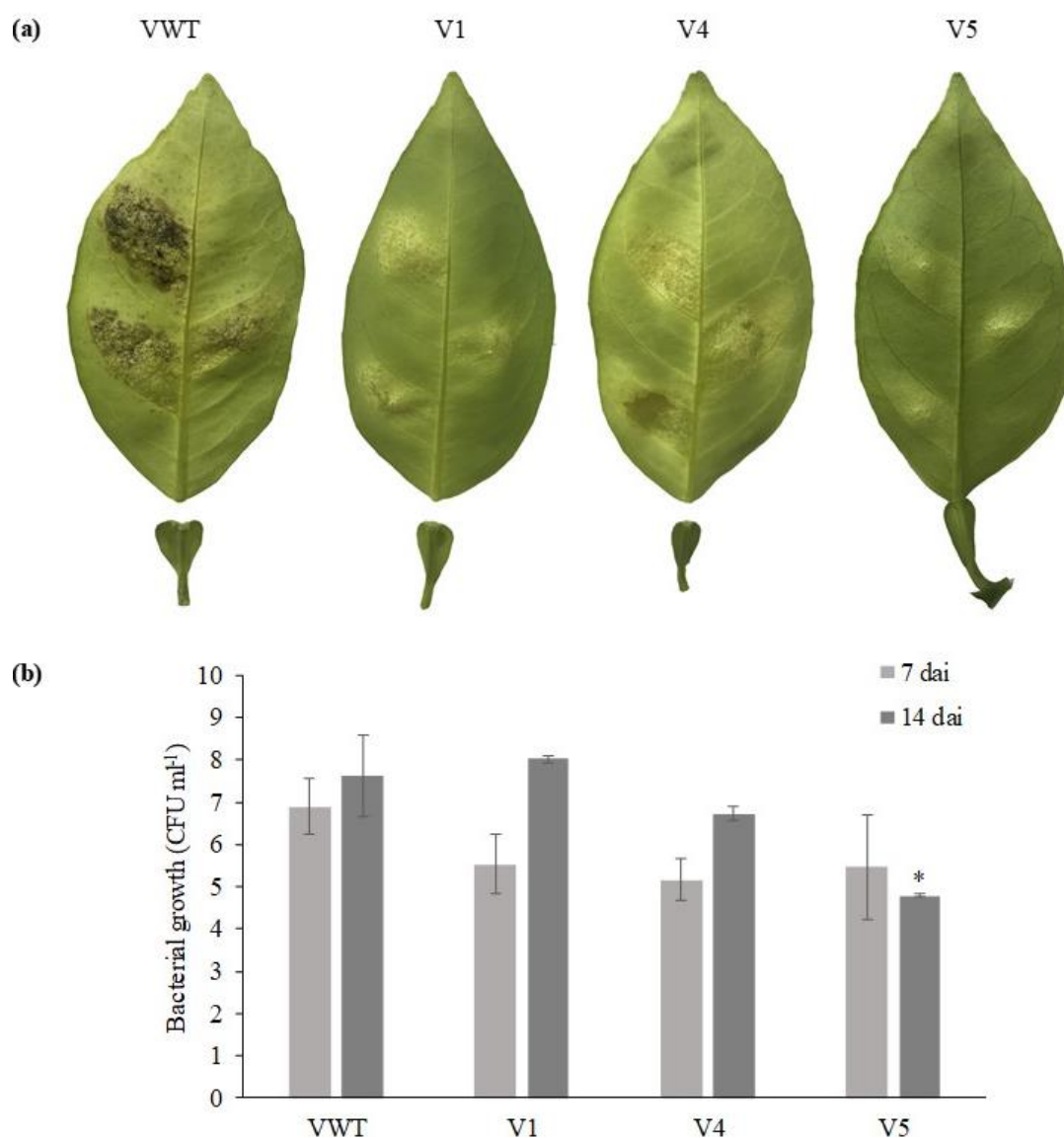


Fig. 5 Citrus canker assay in detached leaves of transgenic sweet orange (H1, V4 and V5) and WT. Three expanded leaves of each plant were infiltrated with *X. citri* expressing GFP protein with 10^4 CFU mL⁻¹ and the assay was evaluated 7 and 14 days after bacterial inoculation in transgenic lines in comparison to the WT. Evaluation of citrus canker symptoms (a) and bacterial growth obtained under fluorescence microscopy (b) 14 days after bacterial inoculation. Data are expressed in log₁₀ and represent means $\pm$ standard error of three independent lesions. *indicate the values are significantly different compared to WT by Student's *t*-test with $P < 0.05$.

***EFR* transgenic lines prevent *X. fastidiosa* movement and decrease CVC symptoms**

Ten clones from each Valencia transgenic lines (V1, V4 and V5) were challenged with *X. fastidiosa* to analyze their potential in confer bacterial resistance. The percentage of

positive plants confirmed by PCR was 52.38% of the total infected plants. The positive plants were selected to further analyses of bacterial population and movement through the plant

The bacterial population was quantified by qPCR. A total of 71% of the transgenic plants were colonized only at 5 cm above of the inoculation point (aip), indicating that, somehow, bacterial migration through the xylem vessels was prevented (Fig. 6a). In the other lines (V1.6 and V5.10), the bacteria showed similar behavior to what observed for WT plants, where the bacteria colonized in a more distal region at 30 cm aip (Fig. 6a). These results suggest a tendency towards lower colonization capacity of *X. fastidiosa* in the transgenic plants, given the long time after bacteria inoculation (18 months). Corresponding what is expected for *X. fastidiosa*, the lines that showed more bacterial colonization V5.10 and V1.6, were those that exhibited CVC symptoms (Fig. 6b). On the other hand, the severity of the symptoms was much lower than observed to WT (Fig. 6c), suggesting that other factors are involved with symptoms severity. Curiously, no symptoms were observed in the lines where the bacteria were not able to move far from the inoculation point. Together these results suggest that somehow the effect of EFR receptor is interfering in long-distance colonization.

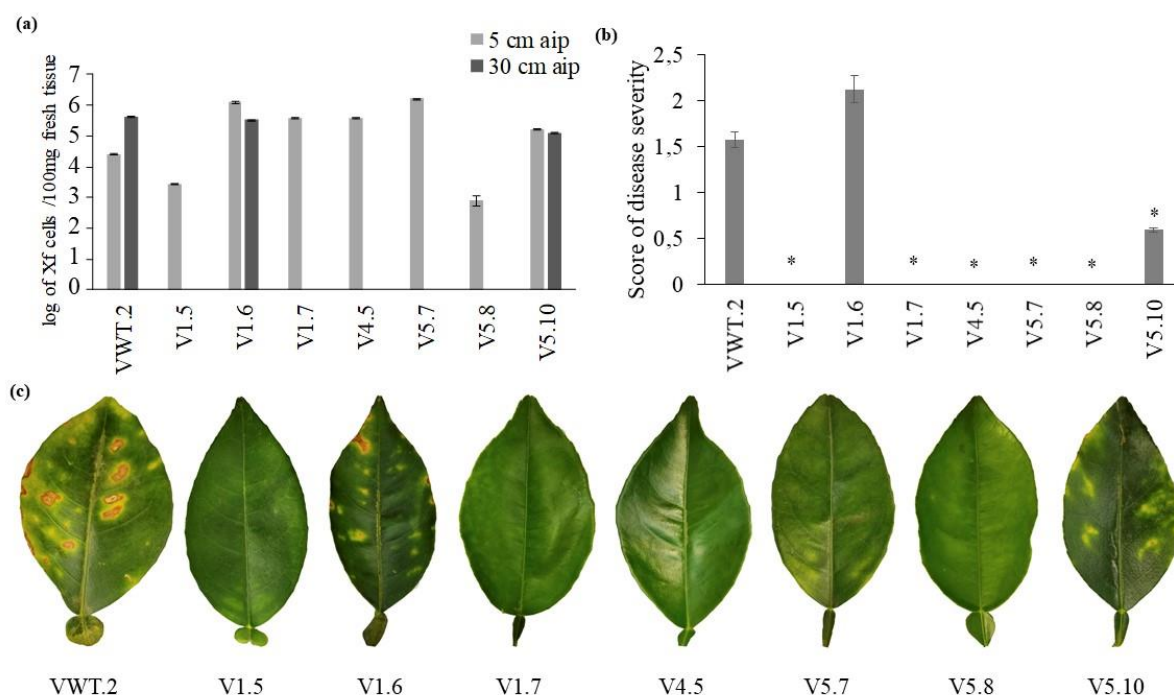


Fig. 6 Evaluation of bacterial growth and CVC symptoms. (a) The population of *X. fastidiosa* was evaluated at two different regions of the plant (5 and 30 aip) 18 months after inoculation. (b) Score of CVC severity and (c) CVC symptoms in the leaves are shown to transgenic lines and WT.

Discussion

The citrus canker and CVC are amongst the main diseases affecting sweet orange production, especially in Brazil. All sweet orange commercial varieties are susceptible to both diseases and, despite many efforts, no natural resistance has been found in *C. sinensis* so far. Although the most effective approach for citrus breeding is based on gene introgression from close relatives, obtaining varieties carrying durable resistance combined with desirable agronomic traits can be challenging.

Our understanding of plant immunity has been increasing over the years and supports the manipulation of plant genotypes to improve crop fitness as well as the ability to cope with biotic and abiotic stresses. Several studies have used interfamily transfer of PRR receptors to improve plant immunity focusing on a durable broad-spectrum strategy for pathogen resistance (Zipfel & Oldroyd, 2017). The heterologous expression of EFR receptor, the *Brassicaceae*-specific PRR recognizing bacterial EF-Tu, conferred resistance and increased the defense response against several bacterial pathogens in tomato, tobacco, rice, wheat, potato and *M. truncatula* (Zipfel et al., 2006; Lacombe et al., 2010; Schoonbeek et al., 2015; Holton et al., 2015; Lu et al., 2015; Schwessinger et al., 2015; Boschi et al., 2017; Pfeilmeier et al., 2019), but no work has been done using EFR receptor to confer resistance to citrus bacterial diseases.

In this work, we developed the first perennial tree expressing the *EFR* receptor from *A. thaliana* attempting to improve broad-spectrum bacterial resistance in sweet orange. Besides of evaluating transgenic plants for citrus canker tolerance, we also challenged plants with *X. fastidiosa*, the causal agent of CVC. The fastidious behavior of *X. fastidiosa* to produce symptoms under greenhouse conditions is demanding and requires long-term trials (> one year), unlike the bacterial pathogens evaluated in previous works.

The transference of EF-Tu-EFR system for both Hamlin and Valencia varieties were effective to recognize elf18_{Ec}, inducing ROS production, MAPK activation and defense-related gene expression. Despite the activation of the citrus defense system by elf18_{Ec}, it was necessary to increase the concentration of elf18_{Xcc} and elf26_{Xf} peptides to achieve reproducible results in citrus, different from what was previously reported for *Arabidopsis* (Lacombe et al., 2010). Unlike citrus, rice transgenic lines expressing the EFR receptor sense elf18_{Ec} and elf18_{Xoo} from *X. oryzae* using the same sub-nanomolar concentration (Schwessinger et al., 2015). Both elf18_{Xoo} and elf18_{Xcc} have the same amino acid sequence and the need for a higher concentration for elf18_{Xcc} signaling is likely to be due to citrus leaves feature. Citrus leaves contain suberin, thick cuticle, phenolics, wax and cork layers

that making the peptide recognition more difficult comparatively to what is observed for *Arabidopsis* and rice. Using a similar strategy, Schoonbeek et al. (2015) reported that in EFR-expressing wheat ROS production was never detected. However, the authors pointed out that even lacking oxidative burst using the same methodology the plants showed activation of the immune system towards alternative pathways (Schoonbeek et al., 2015).

Since we proved that EFR transgenic lines are capable of sensing the EF-Tu of citrus bacterial pathogens, we hypothesize that it is serving as a substrate for EFR ectodomain function during the course of colonization. The EF-tu-enriched biofilm in both *X. citri* and *X. fastidiosa* (Silva et al., 2011; Zimaro et al., 2013) support this hypothesis. Thus, we demonstrated that some transgenic plants were able to recognize both pathogens, decreasing the disease symptoms over the time and reducing bacterial growth within the plant.

Under field conditions, *X. citri* infects the plant through wounds or natural openings such as stomata but here we used detached leaves infiltration methods to evaluate citrus canker development. Although the infiltration method evades the natural process of infection and the initial pathogen recognition by PTI, previous work has shown that the transfer of this type of PRR receptor to citrus can be effective and also evaluated using adapted assays. The FLS2 receptor from *N. tabacum* was overexpressed in sweet orange and transgenic lines showed reduced symptoms compared to control plants. The most significant results were obtained with spray inoculation but using infiltration method was possible to observe differences using low concentration inoculum (10^3 and 10^4 CFU ml⁻¹) (Hao et al., 2016), the same concentration used in this work. Additionally, transgenic mandarin overexpressing Xa21 receptor showed significant reduction of citrus canker lesions and lower bacterial multiplication after infiltration with the pathogen in the leaves (Omar et al., 2017). Transgenic sweet orange with the *Xa21* gene has been tested under greenhouse conditions and were identified transgenic lines with greater resistance against *X. citri* in comparison to non-transgenic plants (Mendes et al., 2010). In the field, we expect that spray inoculation can activate higher levels of resistance by reproducing more similarly the natural process of bacterial infection.

It is the first time that transgenic plants expressing PRR receptors have been challenged with *X. fastidiosa*. This fastidious plant bacteria are slow-growing and therefore require more time for symptom onset and disease evaluation. However, it was found that in most EFR transgenic lines the bacteria did not colonize the most distal regions of the inoculation point. Even in the transgenic lines with higher bacterial colonization there was less severity of symptoms compared to wild-type (Fig. 6). This is probably because at high

bacterial concentrations the biofilm expresses large amounts of the EF-Tu protein (Silva et al., 2011) and can be quickly recognized by the EFR receptor, activating PTI (Fig. 5). The outer membrane vesicles (OMVs) produced by Gram-negative bacteria including *X. fastidiosa* have been reported to contain abundant EF-Tu protein (Matsumoto et al., 2012; Nascimento et al., 2016). The OMVs may move along the xylem vessels releasing the EF-Tu protein that is recognized by EFR receptor. In this way, the immune system of the plant is activated and prevents colonization and establishment of bacteria in the plant. Our results show that this approach can be applied to obtain resistance in agriculturally relevant species that *X. fastidiosa* causes disease, such as grapevine, olives, almonds and coffee.

We observed MAPK activation in the negative control of V5 line, without PAMP treatment (Fig. 3). This constitutive activation of immune responses might be a result of ectopic EFR overexpression. It has been suggested that the auto-activation of immune system leads to a ligand-independent enhanced disease resistance (Holton et al., 2015). This pattern is well known in humans, especially in cancer-related receptors. For example, the HER2 are capable of ligand-independent activation when overexpressed or mutated, causing hyperproliferation and cancer (TCGA, 2012). Although the V5 line has a constitutively active immune system, there is greater MAPK accumulation after PAMP treatment, indicating that increased disease resistance is not directly associated with receptor auto-activation.

To the best of knowledge, citrus lacks receptors capable of recognizing EF-Tu. Although the EFR receptor is restricted to the *Brassicaceae* family, recognition of EF-Tu by an unknown receptor has been shown in rice (Furukama et al., 2014). It is worthy to mention that since *C. sinensis* harbors 300 LRR-RK receptors with unknown functions (Magalhães et al., 2016) the same hypothesis should not be discarded. Furthermore, two LRR-RK receptors were highly expressed in *C. reticulata* after infection with *X. fastidiosa* (Rodrigues et al., 2013). These genes were classified as LRR-XII group (Magalhães et al., 2016) and are likely to be associated with the recognition of some *Xylella*-derived PAMP.

In summary, our results showed that expression of *EFR* gene in sweet orange triggers ligand-dependent activation of defense responses, leading to greater resistance against citrus bacterial pathogens. Although transgenic crops developed to express PRR receptors have not been characterized in the field, conferring broad-spectrum resistance is a strategic approach that may support the citrus breeding program in the future.

References

- Boller T, Felix G. 2009.** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology* **60**: 379–406.
- Boutrot F, Zipfel C. 2017.** Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review Phytopathology* **55**: 257–286.
- Boschi F, Schvartzman C, Murchio S, Ferreira V, Siri MI, Galvan GA, Smoker M, Stransfeld L, Zipfel C, Vilaró FL, Dalla-Rizza M. 2017.** Enhanced bacterial wilt resistance in potato through expression of *Arabidopsis* EFR and introgression of quantitative resistance from *Solanum commersonii*. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2017.01642.
- de Carvalho S, de Carvalho Nunes WM, Belasque-Júnior J, Machado MA, Croce-Filho J, Bock CH, Abdo Z. 2015.** Comparison of resistance to asiatic citrus canker among different genotypes of citrus in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. *Plant Disease* **99**: 207–218.
- Caserta R, Teixeira-Silva NS, Granato LM, Dorta SO, Rodrigues CM, Mitre LK, Yochikawa JTH, Nascimento CA, Souza-Neto RR, Takita MA, Boscariol-Camargo RL, Machado MA, De Souza AA. 2020.** Citrus Biotechnology: What have we done to improve disease resistance in such important crop? *Biotechnology Research & Innovation Journal*
- Doyle JJ; Doyle, JL. 1990.** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* **12**: 13–15.
- Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che FS. 2014.** Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **27**: 113–124.
- Gomez-Gomez L, Boller T. 2000.** FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011.
- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Glawischnig E, Lee J, Felix G, Nürnberger T. 2007.** Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 32338–32348.
- Hao G, Pitino M, Duan Y, Stover E. 2015.** Reduced susceptibility to *Xanthomonas citri* in transgenic citrus expressing the FLS2 receptor from *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **29**: 132–142.
- Helft L, Reddy V, Chen X, Koller T, Federici L, Fernández-Recio J, Gupta R, Bent A. 2011.** LRR conservation mapping to predict functional sites within protein leucine-rich repeat domains. *PLoS ONE* **6**: e21614.
- Helft L, Thompson M, Bent AF. 2016.** Directed Evolution of FLS2 towards Novel Flagellin Peptide Recognition. *PLoS ONE* **11**: e0157155.
- Holton N, Nekrasov V, Ronald PC, Zipfel C. 2015.** The phylogenetically-related pattern recognition receptors EFR and XA21 recruit similar immune signaling components in monocots and dicots. *PLoS Pathogens* **11**: e1004602
- Hind SR, Strickler SR, Boyle PC, Dunham DM, Bao Z, O'Doherty IM, Baccile JA, Hoki JS, Viox EG, Clarke CR, Vinatzer BA, Schroeder FC, Martin GB. 2016.** Tomato receptor

FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nature Plants* **2**: 16128.

Katsuragi Y, Takai R, Furukawa T, Hirai H, Morimoto T, Katayama T, Murakami T, Che FS. 2015. CD2-1, the C-terminal region of flagellin, modulates the induction of immune responses in rice. *Molecular Plant Microbe Interactions* **28**: 648–658.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. 2004. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**: 3496–3507.

Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz B, Jones, JDG, Zipfel C. 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology* **28**: 365–369.

Li D, Xiao X, Guo W. 2014. Production of transgenic anliucheng sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with Xa21 gene for potential canker resistance. *Journal of Integrative Agriculture* **13**: 2370–2377.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**: 402–408.

Lu F, Wang H, Wang S, Jiang W, Shan C, Li B, Yang J, Zhang S, Sun W. 2015. Enhancement of innate immune system in monocot rice by transferring the dicotyledonous elongation factor Tu receptor EFR. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**: 641–652.

Magalhães DM, Scholte LLS, Silva NV, Oliveira GC, Zipfel C, Takita MA, De Souza AA. 2016. LRR-RLK family from two *Citrus* species: genome-wide identification and evolutionary aspects. *BMC Genomics* **17**: 623.

Matsumoto A, Huston SL, Killiny N, Igo MM. 2012. XatA, an AT-1 autotransporter important for the virulence of *Xylella fastidiosa* Temecula1. *Microbiology Open* **1**: 33–45.

Mendes BMJ, Cardoso SC, Boscariol-Camargo RL, Cruz RB, Mourão Filho FAA, Bergamin Filho A. 2010. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathology* **59**: 68–75.

Mendonça LBP, Zambolim L, Badel JL. 2017. Bacterial citrus diseases: major threats and recent progress. *Journal Bacteriol Mycol Open Access* **5**: 340–350

Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC, Stall RE. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* **84**: 456–461.

Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD. 2004. The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* **135**: 1113–1128.

Oliveira A C, Vallim MA, Semighini CP, Araújo WL, Goldman GH Machado MA. 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* **92**: 1048–1054.

Omar AA, Murata MM, El-Shamy HA, Graham JH, Grosser JW. 2018. Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing Xa21 from rice. *Transgenic Research*. doi:10.1007/s11248-018-0065-2.

Pfeilmeier, S, George J, Morel A, Roy S, Smoker M, Stransfeld L, Downie JA, Peeters N, Malone JG, Zipfel C. 2019. EFR in *Medicago truncatula* reduces infection by a root

pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. *Plant Biotechnology Journal* **17**: 569–579.

Pruitt RN, Schwessinger B, Joe A, Thomas N, Liu F, Albert M, Robinson MR, Chan LJG, Luu DD, Chen H, Bahar O, Daudi A, De Vleeschauwer D, Caddell D, Zhang W, Zhao X, Li X, Heazlewood JL, Ruan D, Majumder D, Chern M, Kalbacher H, Midha S, Patil PB, Sonti RV, Petzold CJ, Liu CC, Brodbelt JS, Felix G, Ronald PC. 2015. The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a gram-negative bacterium. *Science Advances* **1**: e1500245.

Pruitt RN, Joe A, Zhang W, Feng W, Stewart V, Schwessinger B, Dinneny JR, Ronald PC (2017) A microbially derived tyrosine-sulfated peptide mimics a plant peptide hormone. *New Phytologist* **215**: 725–736.

Ranf S, Gisch N, Schaffer M, Illig T, Westphal L, Knirel YA, Sánchez-Carballo PM, Zähringer U, Hückelhoven R, Lee J, Scheel D. 2015. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology* **16**: 426–433.

Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendín L, Filippone P, Torres PS, Qüesta J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov AA, Marano MR. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **20**: 1222–1230.

Rodrigues CM, De Souza AA, Takita MA, Kishi LT, Machado MA. 2013. RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. *BMC Genomics* **14**: 676.

Rodriguez-Moreno L, Song Y, Thomma BP. 2017. Transfer and engineering of immune receptors to improve recognition capacities in crops. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 42–49.

Schoonbeek H, Wang HH, Stefanato FL, Craze M, Bowden S, Wallington E, Zipfel C, Ridout CJ. 2015. *Arabidopsis* EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytologist* **206**: 606–613.

Schwessinger B, Bahar O, Thomas N, Holton N, Nekrasov V, Ruan D, Canlas PE, Daudi A, Petzold CJ, Singan VR, Kuo R, Chovatia M, Daum C, Heazlewood JL, Zipfel C, Ronald PC. 2015. Transgenic expression of the dicotyledonous pattern recognition receptor EFR in rice leads to ligand-dependent activation of defense responses. *PLOS Pathogens* **11**: e1004809

Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA. 2016. A survey of *FLS2* genes from multiple citrus species identifies candidates for enhancing disease resistance to *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *Horticulture Research* **3**: 80.

Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA. 2015. Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. *Molecular Plant Pathology* **16**: 507–520.

Silva MS, De Souza AA, Takita MA, Labate CA, Machado MA. 2011. Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*. *Proteome Science* **9**: 58.

Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, et al. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**: 1804–1806.

Taylor JE, Whitelaw CA. 2001. Signals in abscission. *New Phytologist* **151**: 323–340.

- Koboldt, Daniel C.; Fulton, Robert S.; McLellan, Michael D.; Schmidt, Heather; Kalicki-Veizer, Joelle; McMichael, Joshua F.; Fulton, Lucinda L.; et al. 2012.** Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**: 61–70.
- Wan WL, Fröhlich K, Pruitt RN, Nürnberger T, Zhang L. 2019.** Plant cell surface immune receptor complex signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 18–28.
- Wang, GL, Song WY, Ruan DL, Sideris S, Ronald PC. 1996.** The cloned gene, Xa21, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* **9**: 850–855.
- Wang L, Albert M, Einig E, Furst U, Krust D, Felix G. 2016.** The pattern-recognition receptor CORE of *Solanaceae* detects bacterial cold-shock protein. *Nature Plants* **2**: 16185.
- Zimaro T, Thomas L, Marondedze C, Garavaglia BS, Gehring C, Ottado J, Gottig N. 2013.** Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. *BMC Microbiology* **13**: 186.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006.** Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749–760.
- Zipfel C, Oldroyd GED. 2017.** Plant signaling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**: 328–336. doi: 10.1038/nature22009

Support Information

Table S1. Transformation experiments performed in sweet orange varieties (Hamlin and Valencia) with *EFR* gene. Plant recovered and transformation efficiency are indicated.

Experiment	Variety	N° of explants	N° of shoots	GUS (+) shoots	PCR (+) plants/ Analyzed plants	Transformation efficiency (%)*
1	Hamlin	240	12	1	0/12	0.42
2		288	16	2	2/2	0.69
3		264	111	2	2/2	0.76
4		296	81	1	1/1	0.34
1	Valencia	248	121	5	5/5	2.02
2		188	80	3	3/3	1.60
3		151	101	14	5/14	9.27
4		148	96	17	7/17	11.49

*GUS (+) shoots/total explants infected

CAPÍTULO II: Caracterização *in silico* e análise funcional do candidato a receptor CrLRR-RK e desenvolvimento de plantas transgênicas de *Arabidopsis* e laranja doce

Resumo

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria patogênica de vários hospedeiros e tem sido associada a perdas econômicas nos pomares comerciais de várias culturas em diversas partes do mundo, incluindo a clorose variegada dos citros (CVC) em laranja doce (*Citrus sinensis*) no Brasil. Por outro lado, *Citrus reticulata* é uma das espécies de tangerina resistente a CVC e um genótipo interessante para a busca de fontes de resistência contra *X. fastidiosa*. Trabalhos prévios identificaram em *C. reticulata* genes associados a resistência contra esse patógeno, como por exemplo, genes que codificam receptores LRR-RK (CrLRR-RK). Esse receptor foi posteriormente classificado como pertencente ao grupo XII das LRR-RKs com quinase non-RD, típicos por reconhecer padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), ativando a primeira linha de defesa das plantas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo a análise *in silico* do receptor putativo CrLRR-RK em relação ao seu ortólogo em *C. sinensis* (CsLRR-RK) e produzir plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* e de laranja doce expressando o gene *CrLRR-RK*. Os resultados mostraram que as proteínas possuem domínios LRR e quinase conservados, bem como apresentam hélice transmembrana única. Contudo, existem oito aminoácidos substituídos que sugerem mudanças na conformação tridimensional das proteínas tanto no domínio extracelular (responsável por reconhecer o patógeno), quanto no domínio quinase (responsável por transduzir o sinal biológico). Isso poderia explicar as diferenças no reconhecimento do patógeno por laranja doce e tangerina, sendo um indicativo de que CrLRR-RK é um PRR associado ao reconhecimento de PAMPs derivados de *X. fastidiosa* em *C. reticulata*. Para provar essa hipótese, plantas de *Arabidopsis* expressando *CrLRR-RK* e construções quiméricas entre CrLRR-RK e o receptor FLS2 foram produzidas. Essas plantas darão suporte a estudos futuros para comprovar empiricamente a funcionalidade do receptor e posteriormente buscar por PAMPs capazes de se ligar ao domínio extracelular da proteína. Além disso, também foram produzidas variedades comerciais de laranja doce expressando o gene *CrLRR-RK* com o intuito de verificar se esse receptor poderá conferir maior nível de tolerância a patógenos bacterianos de citros, que futuramente poderão suportar os programas de melhoramento genético.

1. Introdução

A clorose variegada dos citros (CVC) foi identificada em 1987 no estado de São Paulo (Rossetti & de Negri, 1990), porém apenas em 1993 seu agente causal foi descrito como sendo uma bactéria Gram-negativa que se desenvolve nos vasos do xilema, denominada inicialmente de *Xylella fastidiosa* (Chang et al., 1993; Hartung et al., 1994) e posteriormente *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* (Schaad et al., 2004; Schuenzel et al., 2005). A bactéria é transmitida e disseminada nos pomares por insetos vetores de diferentes espécies de cigarrinhas (Roberto et al., 1996; Krügener et al., 2000; Yamamoto et al., 2002), embora a propagação de borbulhas infectadas também tenha sido considerada no passado uma das grandes causas de disseminação da doença a longas distâncias (Roberto et al., 2002), o que foi eliminado devido a mudança de legislação em 2003 da obrigatoriedade de produção de mudas de citros em sistema protegido. Após a identificação do agente causal da CVC e das formas de transmissão dentro dos pomares, as pesquisas se direcionaram por várias áreas do conhecimento para melhor entender os mecanismos de patogenicidade da bactéria na planta, assim como para desenvolver estratégias de controle e manejo da CVC nos pomares.

A CVC afeta todas as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*), mas o grupo das tangerinas (*C. reticulata* e *C. clementina*) é resistente à doença, tornando-o fonte para busca de resistência contra *X. fastidiosa* (Laranjeira et al., 1998; Coletta-Filho et al., 2007). Diante disso, alguns trabalhos de expressão global e RNAseq foram realizados nessas espécies contrastantes para entender os mecanismos genéticos de resistência das tangerinas contra *X. fastidiosa* (De Souza et al., 2007; 2009; Rodrigues et al., 2013). Foram identificados um conjunto de genes chave em *C. reticulata* na condição de infecção com o patógeno, que podem ser considerados bons candidatos para se obter genótipos resistentes de laranja doce através do melhoramento clássico ou por engenharia genética (Rodrigues et al., 2013).

Um dos genes diferencialmente expressos foi identificado como receptor de reconhecimento de padrões (PRR) do tipo LRR-RK. Os LRR-RK possuem domínio extracelular com repetições ricas em leucina (LRR), domínio transmembrana único e domínio intracelular típico de quinase. No domínio extracelular ocorre o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno/microrganismo (PAMPs/MAMPs) e a quinase é responsável por transferir o estímulo para dentro da célula. Isso leva a ativação do sistema imune da planta, que culmina em rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação de MAPK e indução de genes associados a defesa da planta (Boutrot & Zipfel, 2017). FLS2, EFR e Xa21 são os receptores PRRs mais bem estudados da literatura, os quais já tiveram seus ligantes identificados (Boller & Felix, 2009). O receptor FLS2, responsável

por reconhecer o epítipo flg22 da flagelina das bactérias, e o receptor EFR, que reconhece a proteína EF-Tu da maquinaria de tradução das bactérias, foram primariamente identificados em *Arabidopsis thaliana*. Enquanto FLS2 é amplamente distribuído nas plantas superiores, o receptor EFR é restrito à família das Brassicaceae. (Kunze et al., 2004; Chinchilla et al., 2006; Zipfel et al., 2006).

Devido à importância na resposta de defesa das plantas, a caracterização de alguns LRR-RKs foi realizada em espécies como *Arabidopsis*, arroz, *Populus*, tomate e citros (Diévert et al., 2011; Zan et al., 2013; Sakamoto et al., 2012; Shiu et al., 2004; Fisher et al., 2016; Magalhães et al., 2016). Em citros, análise filogenética identificou diferentes LRR-RKs de duas espécies de citros, *C. clementina* e *C. sinensis* (Magalhães et al., 2016). Os resultados mostraram notável expansão do grupo XII das LRR-RKs em citros, os quais fazem parte os receptores FLS2 e EFR, sugerindo que esses receptores têm papel de grande importância na co-evolução de respostas adaptativas entre hospedeiro e patógeno. Outra característica relevante desses receptores é ter quinase non-RD, que significa a ausência do conservado aminoácido arginina (R) que precede o aspartato (D) catalítico. Essas quinases não possuem capacidade de auto-fosforilação do loop de ativação (Dardick et al., 2012). Um total de 93 de 148 e 94 de 140 receptores LRR-XII foram classificados como quinases non-RD para *C. clementina* e *C. sinensis*, respectivamente. O receptor putativo identificado por Rodrigues et al. (2013), CrLRR-RK, também foi agrupado no clado dos receptores LRR-XII non-RD (Magalhães et al., 2016) e por isso foi levantada a hipótese que este receptor pode estar envolvido no reconhecimento de PAMPs de *X. fastidiosa* em espécies de tangerina, contribuindo para a resistência a CVC desses genótipos.

Para testar a hipótese acima, o Capítulo II propôs inicialmente a caracterização *in silico* do receptor CrLRR-RK para prever sua estrutura e função em relação ao seu ortólogo em laranja doce (CsLRR-RK), com intuito de buscar possíveis modificações que justifiquem as diferenças no padrão de expressão gênica e resistência observado nestas duas espécies. Posteriormente, foi proposto a transferência do gene *CrLRR-RK* para *A. thaliana*, com o objetivo de utilizar plantas modelos para provar a função do receptor como um PRR do tipo LRR-RK. Para isso, foram construídos receptores quiméricos entre CrLRR-RK e o receptor FLS2 (FLS2:CrLRR-RK e CrLRR-RK:FLS2). A disponibilidade da quimera FLS2:CrLRR-RK permitirá a avaliação da ativação do domínio intracelular de CrLRR-RK em resposta à ligação de flg22 ao domínio extracelular de FLS2. Do mesmo modo, plantas contendo os genes CrLRR-RK e CrLRR-RK:FLS2 poderão ser utilizadas para investigar possíveis PAMPs que podem se ligar a região extracelular do receptor putativo. Essa estratégia já foi

utilizada para outros receptores filogeneticamente relacionados como FLS2, EFR e Xa21 para confirmação de funcionalidade e para determinar se os componentes *downstream* da ativação da resposta de defesa são conservados entre eles (Alberts et al., 2010; Holton et al., 2015; Schwessinger et al., 2015). Também foram desenvolvidas variedades comerciais de laranja doce expressando o gene *CrLRR-RK*. Esta estratégia é uma maneira mais aplicada de avaliar possíveis níveis de resistência da planta contendo o novo gene diante do desafio com patógenos bacterianos de citros. Como esse tipo de receptor é capaz de reconhecer PAMPs altamente conservados e essenciais para a viabilidade dos patógenos, abre-se a possibilidade do candidato a receptor CrLRR-RK atuar como fonte de resistência em amplo espectro e reconhecer outras bactérias tais como *X. citri*, que possui alta similaridade genômica com *X. fastidiosa* (da Silva et al., 2002).

2. Objetivos

- Fazer a caracterização estrutural e funcional do candidato a receptor CrLRR-RK e de seu ortólogo em *C. sinensis*.
- Gerar plantas transgênicas de *A. thaliana* expressando os genes *CrLRR-RK* e *FLS2*, assim como os genes quiméricos *CrLRR-RK:FLS2* e *FLS2:CrLRR-RK*.
- Gerar variedades transgênicas de laranja doce expressando o gene *CrLRR-RK* para desafio com *X. fastidiosa* e *screening* de genótipos apresentando maior nível de tolerância a CVC.

3. Material e Métodos

3.1 Análise *in silico* do gene candidato *CrLRR-RK*

A sequência do gene *CrLRR-RK* altamente expressa em *C. reticulata* e que possui cópia idêntica no genoma de *C. clementina* (Ciclev10014130m) foi utilizada para fazer Blastn contra o genoma de *C. sinensis* para busca de gene ortólogo. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) para identificação de possíveis diferenças na sequência das proteínas. Para determinar os domínios, foram utilizados os softwares MyDomains (<https://prosite.expasy.org/index.html>), SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/0>) e TMHMM Server v.2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). A predição estrutural das proteínas foi feita no I-Tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), de acordo com o banco de dados de proteína PDB. O alinhamento estrutural e manipulação dos modelos 3D das

proteínas foram realizados através do software PyMol. O dendograma dos receptores foi realizado no Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>).

3.2 Sequências gênicas e vetores para transformação genética de plantas

A sequência gênica de *CrLRR-RK* utilizada foi baseada inicialmente na versão 0.9 (clementine0.9_001431m) do genoma de *C. clementina* que, posteriormente, foi atualizada para a versão 1.0 (Ciclev10014130m). Com a atualização da anotação do genoma, o gene sofreu algumas modificações na sua sequência proteica, que podem ser vistas no alinhamento do Anexo 1.

O vetor utilizado para transformar laranja doce foi sintetizado pela empresa *Cloning Service* a partir da sequência do gene *CrLRR-RK* da versão 0.9, sob o controle do promotor constitutivo FMV (promotor do vírus do mosaico da escrofulária). Esse vetor contém o gene repórter *gus* (β -glucuronidase), confere resistência a espectinomicina e estreptomicina em bactérias e canamicina em plantas (Figura 1A e Anexo 2). Para transformar *Arabidopsis*, utilizamos o gene *CrLRR-RK* da versão 1.0 para a construção de receptores quimeras com o gene *FLS2*. Os genes *CrLRR-RK*, *FLS2* e os genes quiméricos foram clonados no vetor pEarleyGate 103 (fornecido pela Dra. Pamela Ronald, UC-Davis), que confere resistência a canamicina em bactérias e ao herbicida BASTA (glufosinato de amônio) em plantas. Os genes clonados neste vetor estão sob controle do promotor 35S, fusionados ao gene *gfp* e a uma cauda de histidina (6x His) (Figura 1B e Anexo 3).

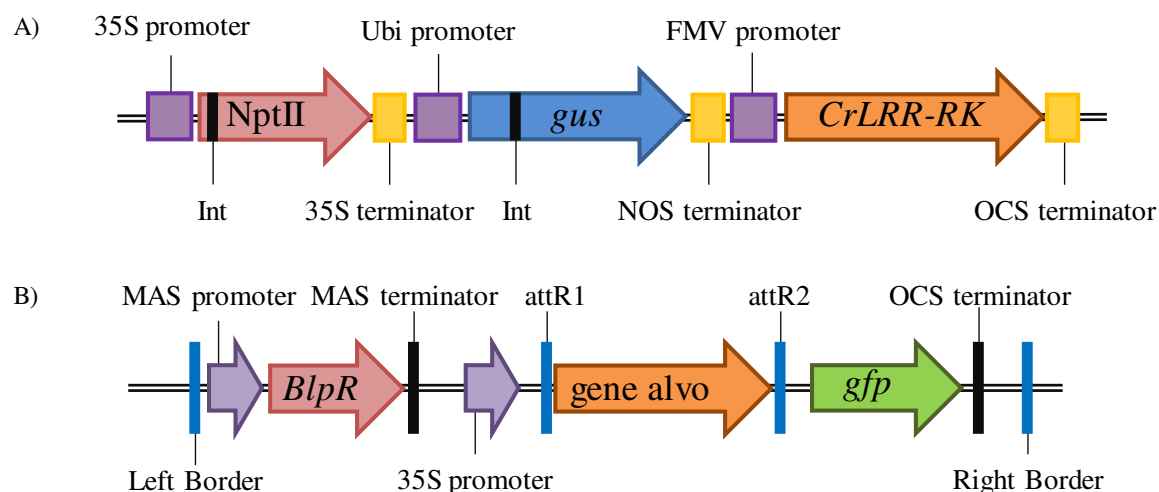


Figura 1: Esquema das construções gênicas para superexpressão em planta. (A) Vetor contendo o gene *CrLRR-RK* sob controle do promotor constitutivo FMV. (B) Vetor que contém os genes *CrLRR-RK*, *FLS2* e os genes quiméricos sob controle do promotor constitutivo 35S. Left e Right Border: borda direita e esquerda do T-DNA, respectivamente; attR1 e attR2: sítios de recombinação homóloga; *gfp*: gene repórter que codifica a proteína verde fluorescente GFP; *gus*: gene repórter que codifica a enzima β -glucuronidase; 35S: promotor do vírus do mosaico da couve-flor; Ubi: promotor do gene ubiquitina; FMV: promotor do vírus do mosaico da escrofulária; OCS: terminador do gene octopina sintetase; MAS: promotor e terminador do gene manopina sintase; NOS: terminador do gene que codifica a nopalina sintase; *BlpR* e *NptII*: gene marcador que confere resistência ao herbicida glufosinato de amônio e canamicina, respectivamente; int: íntron.

3.3 Síntese dos genes quiméricos e clonagem no vetor de expressão para transformação de *Arabidopsis*

FLS2, *CrLRR-RK* e os fragmentos gênicos foram amplificados a partir do cDNA de *A. thaliana* (Col-0) e *C. reticulata*. As quimeras foram produzidas pela fusão do domínio extracelular (LRR) e transmembrana (TM) de um dos receptores com o domínio intracelular (KIN) do outro receptor. Primers específicos foram sintetizados para amplificar os alvos e gerar uma extensão *overlap* entre dois fragmentos de DNA, necessário para a fusão de dois fragmentos gênicos em uma segunda PCR. Os primers *forward* possuem a sequência CACC na extremidade 5' para que se obtenha fragmentos de DNA com uma sequência *overhang* no vetor de destino pENTR/D-TOPO (Gateway vector; Invitrogen), permitindo assim a clonagem direcional dos alvos. Os primers reversos não precisam de sequência complementar no vetor, mas o *stop códon* foi removido para fusionar os produtos da PCR

em *frame* com a extremidade C-terminal do *gfp* no vetor de destino pEarleyGate 103. Todas as PCRs foram feitas com Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). No Anexo 4 encontram-se todas as sequências de primer utilizadas nessa etapa, bem como as condições das PCRs utilizadas.

Os tamanhos dos produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% e as bandas de interesse foram excisadas e purificadas com o kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega). Após a purificação das bandas, a concentração dos fragmentos foi verificada utilizando Qubit® fluorometer.

A reação de clonagem continha o produto de PCR purificado, solução de sal e o vetor linear pENTR/D-TOPO, sendo realizada de acordo com as normas do fabricante. O mix foi incubado a temperatura ambiente por 30 min e colocado em gelo antes de transformar a célula competente de *Escherichia coli*. A transformação foi feita via choque térmico em *E. coli* One Shot TOP10 ou Mach1™-T1R e a suspensão bacteriana foi selecionada em placas de LB contendo 50 mg L⁻¹ de canamicina e incubado a 37°C *overnight*. As colônias individuais foram isoladas e verificadas quanto a presença do transgene por PCR. Os vetores de interesse das colônias positivas foram isolados utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System e sequenciados pela ^{UC}DNA Sequencing Facility (UC-Davis). Os primers utilizados no sequenciamento encontram-se no Anexo 5.

A recombinação LR foi feita para transferir os genes de interesse no vetor de destino pEarleyGate 103. A reação continha o vetor de entrada, o vetor de destino, a enzima LR clonase (Thermo Scientific) e foi realizada de acordo com as especificações do fabricante. O volume de reação foi incubado a 25°C por 1 hora. Em seguida, solução de Proteinase K foi adicionada e incubada por 10 min a 37°C. 2 µl da reação LR foram utilizados para transformar *E. coli* e PCR foi realizado para confirmar as colônias positivas. DNA plasmidial foi extraído, conforme descrito anteriormente, e utilizado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*.

3.4 Transformação genética de *Arabidopsis*

Os vetores foram transformados em *Agrobacterium* via eletroporação na estirpe GV3101, utilizando 1 µg de DNA. As colônias transformadas foram selecionadas em meio LB contendo 50 mg L⁻¹ de rifampicina e 100 mg L⁻¹ de canamicina. Colônias de *Agrobacterium* confirmadas por PCR foram utilizadas para a transformação do ecótipo Wassilewskija-0 (WS-0) de *A. thaliana* via “*spray floral dip*”, método adaptado de Chung et

al. (2000). WS-0 é um genótipo naturalmente insensível a flagelina devido a presença de um *stop codon* prematuro na sequência do gene *FLS2*, gerando uma proteína truncada.

As sementes de *Arabidopsis* foram germinadas em substrato:vermiculita (3:1) e mantidas em câmara fria (4°C no escuro) por dois dias para quebrar a dormência das sementes. Em seguida, foram transferidas para câmara de crescimento (intensidade de luz 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, 20-22°C) até o florescimento. Os primeiros botões florais foram removidos para estimular a proliferação de brotos secundários até entre 4-6 semanas.

Dois dias antes da transformação, 5 ml de pré-inóculo de *Agrobacterium* foi crescido em meio LB (28°C, 200 rpm) suplementado com rifampicina (50 mg L^{-1}) e canamicina (100 mg L^{-1}). No dia seguinte, foi adicionado 1 ml do pré-inóculo em 500 ml de meio LB e o crescimento bacteriano foi acompanhando até atingir $\text{OD}_{600} = 0.8$. A cultura bacteriana foi centrifugada (8 min, 2800 rpm) e ressuspensa em solução de sacarose (5%) contendo Silwet L-77 (0,05%), seguindo para o spray da cultura nas inflorescências da planta. O spray foi repetido após 5-7 dias da primeira infecção. Quando as siliques se tornaram amarelas, as sementes foram coletadas e armazenadas a 4°C.

3.5 Transformação genética de citros

O vetor foi transformado via choque térmico em *Agrobacterium* (estirpe EH105), utilizando 1 μg de DNA. As colônias transformadas foram selecionadas em meio YEP contendo 50 mg L^{-1} de rifampicina e 100 mg L^{-1} de estreptomicina. As células transformadas foram confirmadas por PCR e utilizadas na transformação de citros.

Sementes foram extraídas de frutos maduros de variedades laranja doce (Hamlin, Pineapple e Valência) e introduzidas em tubos contendo meio MS/2 sólido. As sementes ficaram no escuro para germinação e estiolamento e após 4-6 semanas foram transferidas para fotoperíodo de 16 horas. Com 15 dias, as plântulas estavam prontas para a transformação genética. Segmentos de epicótilo (0,8-1 cm) foram excisados das plântulas e mantidos em meio MS líquido, contendo 100 mg L^{-1} de ácido indolacético (AIA), antes da incubação com *Agrobacterium* (10^8 CFU ml^{-1} , 5 min). Os explantes foram secos e transferidos para placas contendo meio MS de co-cultivo, suplementado com sacarose (30 g L^{-1}), benzilaminopurina (BAP) (10 mg L^{-1}) e mio-inositol (100 mg L^{-1}), que permaneceram em câmara de crescimento por três dias (24°C, escuro). Após o período de co-cultivo, os explantes foram transferidos para meio MS de seleção, contendo 100 mg L^{-1} de canamicina e 250 mg L^{-1} de cefotaxima por quatro dias (28°C, escuro). Depois desse período, as placas foram transferidas para fotoperíodo de 16h. Brotos bem desenvolvidos *in vitro* e confirmados quanto a presença do

transgene foram enxertados no porta-enxerto Limão Cravo (*C. limonia*) e mantidos em casa de vegetação. As plantas matrizes foram utilizadas para produzir clones para subseqüentes avaliações. A eficiência de transformação foi calculada como a porcentagem de brotos GUS positivos pelo número de explantes expostos a cultura de *Agrobacterium*.

3.6 Confirmação das linhagens transgênicas de *Arabidopsis* e laranja doce

A seleção das *Arabidopsis* transformadas foi feita utilizando 100 mg L⁻¹ de herbicida Basta, suplementado com Silwet L-77 (0,05%). As sementes foram espalhadas sobre o solo e, 10 dias após a germinação, foi realizada a primeira aplicação do herbicida via spray. A aplicação seguiu por mais 3 vezes, com intervalos de 2-3 dias, até que fossem eliminadas todas as plântulas não transformadas. DNA genômico (gDNA) foi extraído de folhas das plantas regeneradas pelo método CTAB (Doyle & Doyle, 1990) e PCR foi realizada para confirmação da presença do transgene, utilizando primers específicos (Anexo 4).

Em laranja doce, os brotos resistentes a canamicina foram excisados dos explantes e incubados em solução de X-gluc (37° C, *overnight*) para ensaio histoquímico da atividade da β -glucuronidase (GUS). Para detectar a presença do transgene, o gDNA foi extraído das folhas e PCR foi realizada com primer *forward* para o promotor FMV (5'-TGGCTTGTGGGGACCAGAC-3') e reverso para o gene *CrLRR-RK* (5'-CCAAGGGTATTCGGAATGCT-3').

3.7 Avaliação da expressão gênica dos eventos de laranja doce expressando *CrLRR-RK*

Para determinar a expressão gênica dos eventos, o RNA foi extraído utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen). A concentração do RNA foi normalizada por Nanodrop (Thermo Scientific) e sua qualidade foi verificada em gel de agarose. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). A expressão relativa foi feita utilizando SYBR Prime Script RT-PCR kit (Thermo Scientific) no ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems), utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001). O gene da ciclofilina foi utilizado como controle endógeno (F: 5'-AGAGTATGCAGAGGAATGG-3' e R: 5'-GTCCTTAACAGAAGTCCGT-3'). Foram desenhados dois primers para o gene *CrLRR-RK*, um que amplifica a região LRR (F: 5'-CAGAGAGGCCTTGATCTCATTC-3' e R: 5'-GCAAGGGAGAAGAGCTTTGACTA-3') e outro que amplifica na quinase (F: 5'-GCACTGGACTACCTTCACAAT-3' e R: 5'-TCCCACCTTTGCTGTCATATC-3').

3.8 Desafio de plantas transgênicas com *X. fastidiosa*

X. fastidiosa subsp. *pauca* (estirpe 9a5c) foi cultivada em meio sólido periwinkle gelrite (PWG) por 7 dias (28°C) e ressuspensa em tampão PBS. A inoculação da bactéria foi feita por perfuração de agulhas (Almeida et al., 2001), utilizando suspensão bacteriana de 10^8 CFU ml⁻¹ para a infecção de 10 plantas de cada evento transgênico e seus respectivos controles (WT). Após 30 dias de inoculação, o gDNA foi extraído de pecíolo da primeira folha acima do ponto de inoculação. A presença da bactéria foi confirmada por PCR, utilizando os primers RST31/33 primers (Minsavage et al., 2010). Após o surgimento dos primeiros sintomas, as plantas começaram a ser avaliadas quanto a incidência da doença.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização *in silico* do receptor putativo CrLRR-RK e seu ortólogo em *C. sinensis*

Foi verificado que o gene que codifica o receptor CrLRR-RK possui um ortólogo em *C. sinensis* (CsLRR-RK, XM_006470340.3) com 99,54% de identidade em relação a sua sequência de proteína. Ambos os genes codificam proteínas com 1017 aminoácidos, com domínios conservados associados a proteínas LRR-RK, que incluem a presença do peptídeo sinal, 13 repetições ricas em leucinas (LRR), um domínio transmembrana e um domínio quinase com seus resíduos de cisteína e aspartato característico de proteínas quinase non-RD (Figura 2A e Anexo 6-8). Receptores como o FLS2, EFR e Xa21 possuem proteínas com 1173, 1031 e 1025 aminoácidos e 28, 21 e 24 repetições do tipo LRRs, respectivamente (Gómez-Gómez & Boller, 2000; Zipfel et al., 2006; Song et al., 1995). Estas proteínas são receptores do tipo PRR funcionalmente caracterizados e compartilham 35,22, 42,54 e 40,20% de identidade com CrLRR-RK, respectivamente.

O alinhamento das proteínas de CrLRR-RK e CsLRR-RK revelou a presença de oito aminoácidos diferentes: cinco aminoácidos estão na região extracelular (envolvida no reconhecimento de PAMP), um aminoácido na região transmembrana e dois na região intracelular (responsável pela transdução da resposta PTI) (Figura 2B e Anexo 9). Embora estas alterações estejam presentes, a predição dos domínios em CsLRR-RK foi mantida (Anexo 6). Adicionalmente, verificamos que algumas das substituições não-sinônimas mudam também a carga e polaridade dos aminoácidos (Tabela 1), o que pode alterar a função das proteínas.

Tabela 1: Substituições não-sinônimas de aminoácidos existentes entre as sequências de aminoácidos dos receptores CrLRR-RLK e CsLRR-RLK. A posição e classificação dos aminoácidos são apresentadas.

Posição	CrLRR-RLK		CsLRR-RLK	
	Aminoácido	Classificação	Aminoácido	Classificação
82	Glicina	Apolar	Alanina	Apolar
421	Leucina	Apolar	Prolina	Apolar
534	Alanina	Apolar	Treonina	Polar Neutro
573	Lisina	Polar Básico	Asparagina	Polar Neutro
621	Histidina	Polar Básico	Asparagina	Polar Neutro
654	Valina	Apolar	Isoleucina	Apolar
944	Leucina	Apolar	Glutamina	Polar Neutro
1015	Treonina	Polar Neutro	Alanina	Apolar

Para prever a estrutura e função dessas proteínas, o programa I-TASSER foi utilizado. O resultado mostrou que o receptor FLS2 foi a estrutura mais próxima encontrada para gerar os modelos proteicos dos receptores em questão, com TM-score de 0,726 para CrLRR-RK e 0,727 CsLRR-RK (Anexo 10 e 11). Na Figura 3, são mostrados os modelos estruturais de CrLRR-RK e CsLRR-RK gerados a partir do modelo estrutural já resolvido do receptor FLS2 (PDB hit: 4mn8A). Além disso, de acordo com os resultados gerados pelo programa, a região extracelular de ambos receptores de citros foi preferencialmente associada ao reconhecimento de peptídeos, com C-score de 0,05 para CrLRR-RK e 0,07 CsLRR-RK, indicando a potencial associação ao reconhecimento de PAMPs. O sítio de reconhecimento de peptídeos, gerado de acordo com a predição (PDB hit: 4z5wA e 4z63A), compreende 17 resíduos da região extracelular do receptor (Figura 3A e 3B, Anexo 10 e 11). Contudo, dois aminoácidos são específicos de cada sítio de ligação, Glicina-92 e Serina-140 em CrLRR-RK e Asparagina-186 e Lisina-189 em CsLRR-RK (Figura 3C). No alinhamento do modelo 3D das proteínas fica evidente que existem diferenças estruturais na região LRR e no domínio quinase, que estão evidenciadas com setas vermelhas na Figura 3C.

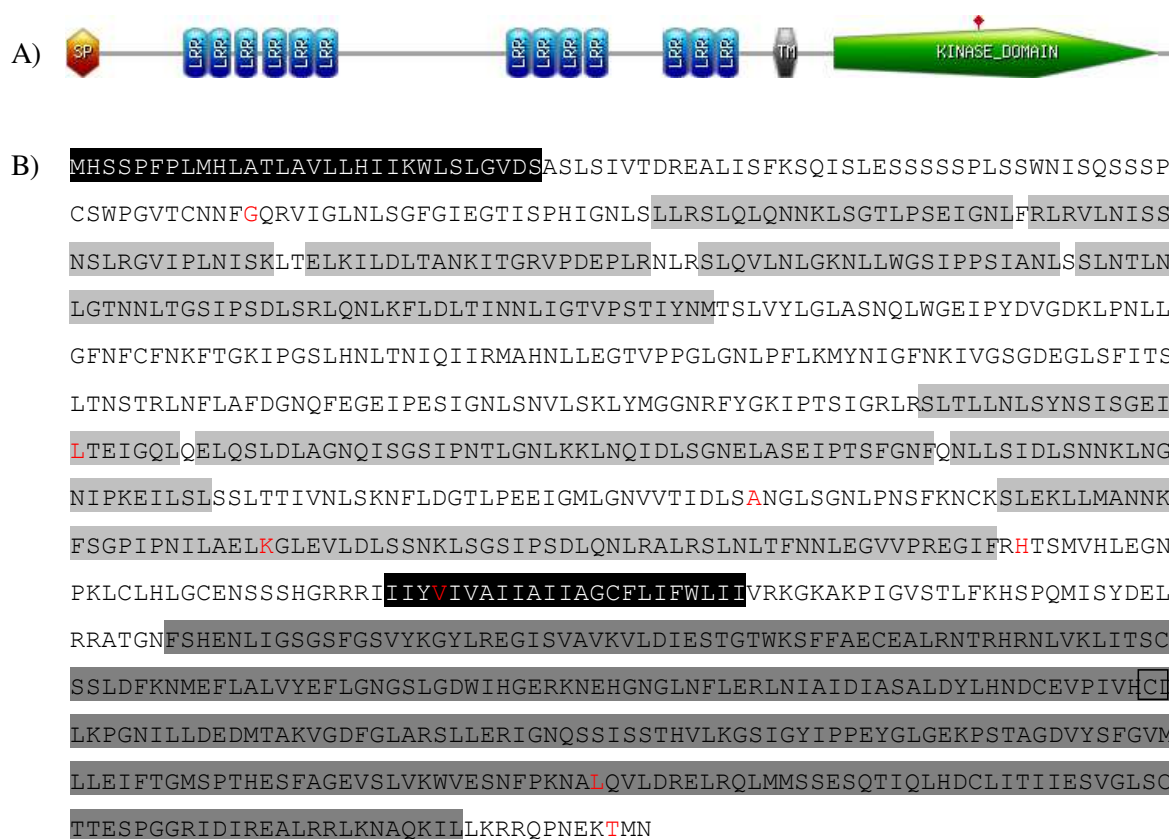


Figura 2: Predição dos domínios do receptor CrLRR-RK. A) Esquema do receptor com seu peptídeo sinal (SP), repetições ricas em leucina (LRR), domínio transmembrana (TM) e domínio quinase, com destaque em vermelho para o sítio ativo da quinase. B) Sequência da proteína com destaques para a localização do peptídeo sinal e domínio transmembrana (preto), LRRs (cinza claro) e domínio quinase (cinza escuro). Está identificado em um box preto os resíduos de cisteína e aspartato (CD) do domínio quinase. Os aminoácidos diferentes em relação ao receptor CsLRR-RK foram marcados de vermelho.

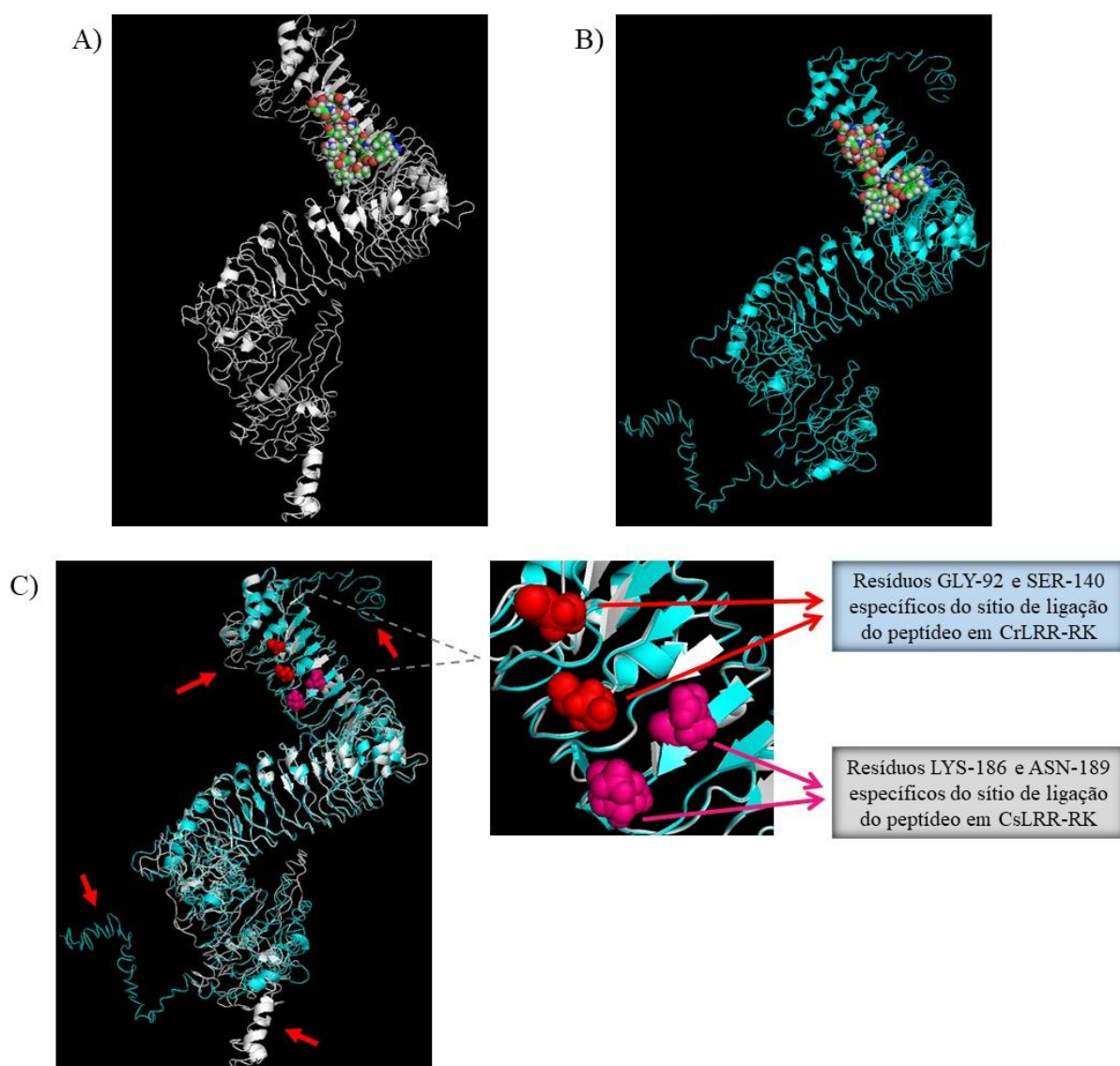


Figura 3: Modelo 3D dos receptores putativos. A, B) Receptores CrLRR-RK (verde) e CsLRR-RK (cinza) com seus respectivos sítios de ligação em destaque (esferas coloridas representam os 17 aminoácidos específicos para a ligação do peptídeo – possível PAMP). C) Alinhamento dos receptores CrLRR-RK e CsLRR-RK, onde são destacados: diferenças na estrutura 3D das proteínas na região LRR e quinase (setas vermelhas); resíduos do sítio de ligação do peptídeo específicos para cada receptor – esferas vermelhas (Glicina-92 e Serina-140) e rosas (Asparagina-186 e Lisina-189) destacam os resíduos específicos para CrLRR-RK e CsLRR-RK, respectivamente.

O alinhamento múltiplo dos receptores putativos de citros e dos principais LRR-RK (FLS2, EFR e Xa21) foi realizado e o dendograma foi gerado. Foi verificado que CrLRR-RK e CsLRR-RK se agruparam, sendo, portanto, mais proximamente relacionados, como previamente descrito por Magalhães et al. (2016). Quando comparado aos demais receptores,

EFR e Xa21 foram os mais relacionados aos receptores putativos de citros, enquanto o receptor FLS2 é o mais distante filogeneticamente (Figura 4). Análises filogenéticas foram previamente realizadas entre LRR-RK de *Arabidopsis* e arroz (Boller & Felix, 2009; Huang et al., 2011). Os autores observaram que o receptor FLS2 é mais distante de Xa21 quando comparado com o receptor EFR, conforme aqui reportado no dendrograma.

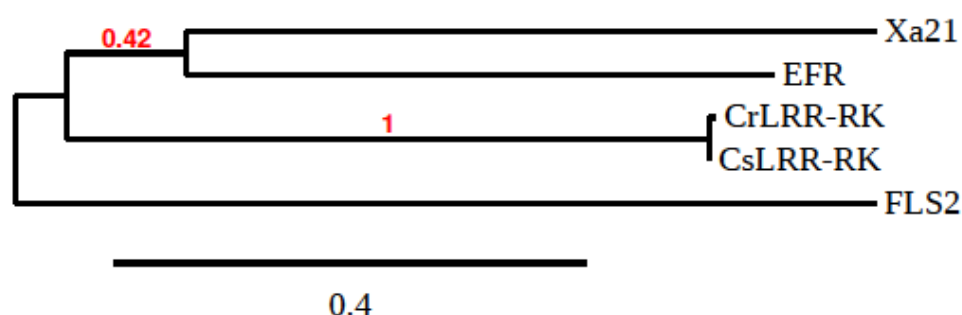


Figura 4: Dendrograma gerado a partir do alinhamento múltiplo entre as sequências de proteínas dos principais receptores LRR-RK (FLS2, EFR e Xa21) e os receptores putativos CrLRR-RK e CsLRR-RK de citros.

Os resultados obtidos com a análise *in silico* revelaram que o receptor CrLRR-RK tem característica de um PRR e pode estar associado ao reconhecimento de PAMPs de *X. fastidiosa*, uma vez que a predição indica a ligação de peptídeo no sítio de ligação das proteínas. Apesar de seu ortólogo em laranja doce também possuir domínios conservados de LRR-RK, as substituições não-sinônimas existentes entre essas duas proteínas sugerem mudança na conformação das proteínas (Fig. 3C), o que pode alterar a especificidade no reconhecimento do PAMP na região LRR e a transdução de sinal pelo domínio quinase.

As análises *in silico* do candidato a receptor CrLRR-RK suportam nossa hipótese inicial de que ele esteja diretamente relacionado ao reconhecimento de algum PAMP derivado de *X. fastidiosa*. Para confirmar essa hipótese, o gene *CrLRR-RK* e genes quimeras com o receptor FLS2 foram transformados em *A. thaliana* para estudo funcional do gene. Pensando em uma estratégia mais aplicada, *CrLRR-RK* foi também transferido para variedades suscetíveis de laranja doce, para avaliação da resposta de defesa das plantas na condição de infecção com patógenos bacterianos de citros.

4.2 Desenvolvimento de plantas de *Arabidopsis* expressando o receptor CrLRR-RK

Essa parte da tese foi desenvolvida em colaboração com a Dra. Maelli Melotto na Universidade da Califórnia em Davis (UC-Davis), com bolsa de doutorado sanduíche associado ao Projeto PVE do Programa Ciências sem Fronteira (Período: janeiro-dezembro/2018 – Processo: 208406/2017-4).

4.2.1 Síntese de genes quiméricos

Para estudar a funcionalidade do receptor CrLRR-RK em *Arabidopsis*, receptores quiméricos entre CrLRR-RK e FLS2 foram construídos, para comparação com CrLRR-RK e FLS2. As quimeras (FLS2:CrLRR-RK e CrLRR-RK:FLS2) foram construídas pela fusão do domínio extracelular (LRR) e transmembrana de um dos receptores com o domínio intracelular (quinase) do outro receptor (Figura 5).

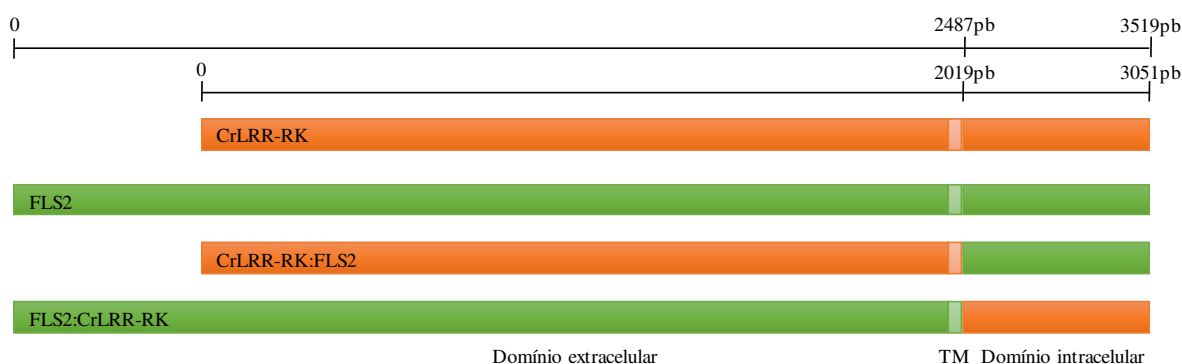


Figura 5: Representação esquemática dos receptores quiméricos construídos nesse trabalho. Domínio extracelular, transmembrana (TM) e intracelular são mostrados.

A primeira etapa da construção das quimeras consistiu na amplificação de cada fragmento separadamente para posterior fusão. Utilizando cDNA de *A. thaliana* e *C. reticulata* como molde, os fragmentos gênicos (LRR e quinase) foram amplificados por PCR e apresentaram os tamanhos de amplicon esperados (Figura 6A-D). As bandas de interesse foram excisadas do gel de agarose e purificadas para serem utilizadas em uma segunda PCR para fusão dos fragmentos e obtenção dos genes quiméricos. Os produtos dessa PCR e o produto da amplificação dos genes completos podem ser verificados na Figura 6E-G.

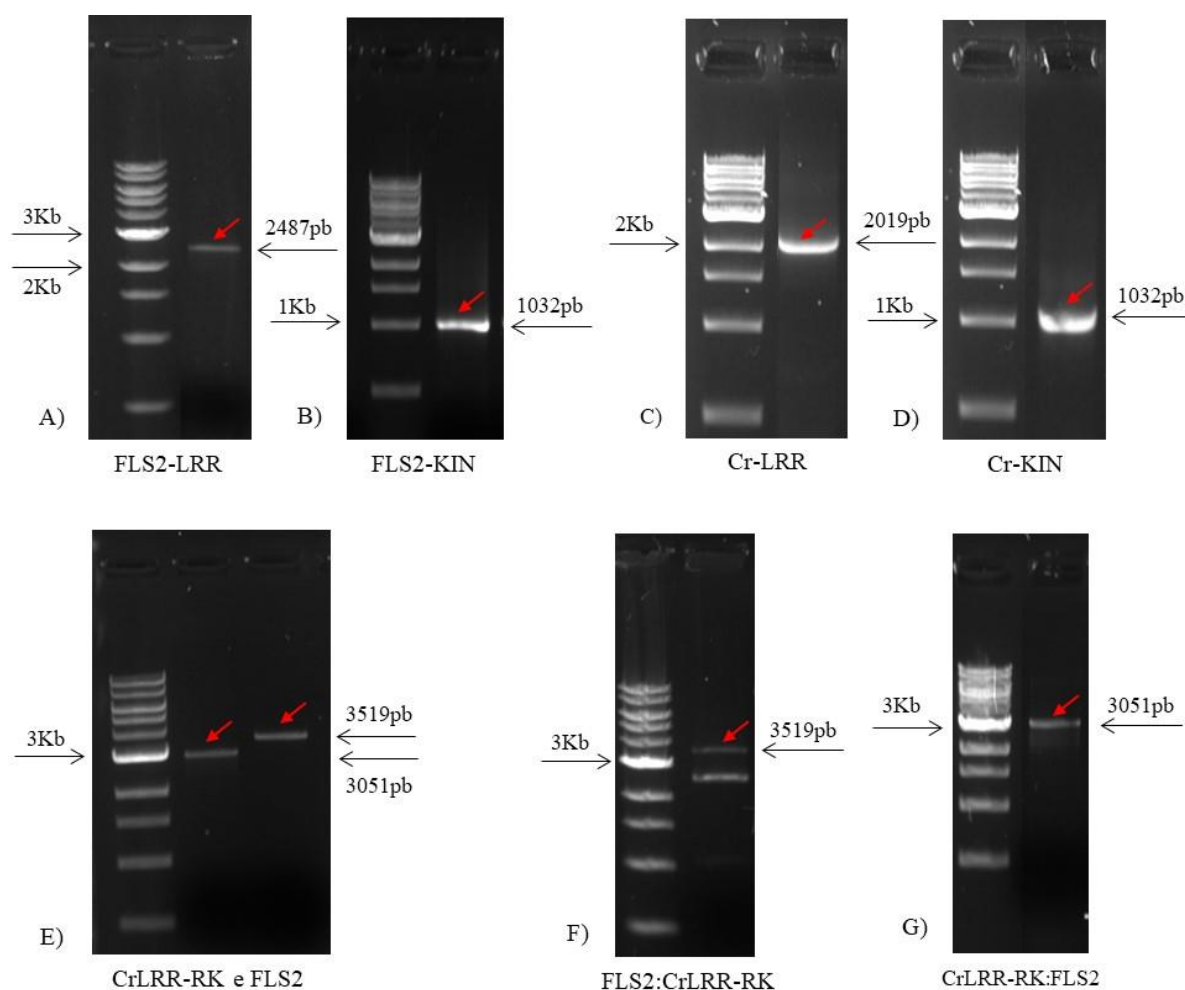


Figura 6: Gel de agarose 1% mostrando os produtos de PCR onde foram amplificados os fragmentos gênicos FLS2-LRR (A), FLS2-KIN (B), Cr-LRR (C) e Cr-KIN (D), os genes completos *CrLRR-RK* e *FLS2* (E) e os genes quiméricos *FLS2:CrLRR-RK* (F) e *CrLRR-RK:FLS2* (G).

4.2.2 Construção do vetor de expressão

Os genes de interesse passaram por clonagem direcional no vetor de entrada pENTR/D-TOPO, que foram transformados em célula competente de *E. coli* para a amplificação do vetor. As colônias foram testadas por PCR quanto a presença do transgene e uma colônia positiva de cada construção foi selecionada para extração plasmidial e sequenciamento. Os vetores foram enviados para ^{UC}DNA Sequencing Facility e os resultados obtidos foram alinhados com as sequências de referência. As sequências de todos os genes estavam íntegras e sem a presença de mutações.

Os vetores de entrada foram utilizados na reação de recombinação homóloga com o vetor de destino pEarleyGate 103. Uma das colônias selecionadas teve seu DNA plasmidial

extraído e a integridade verificada por eletroforese (Figura 7) e sequenciamento para seguir com a transformação em *Agrobacterium*.

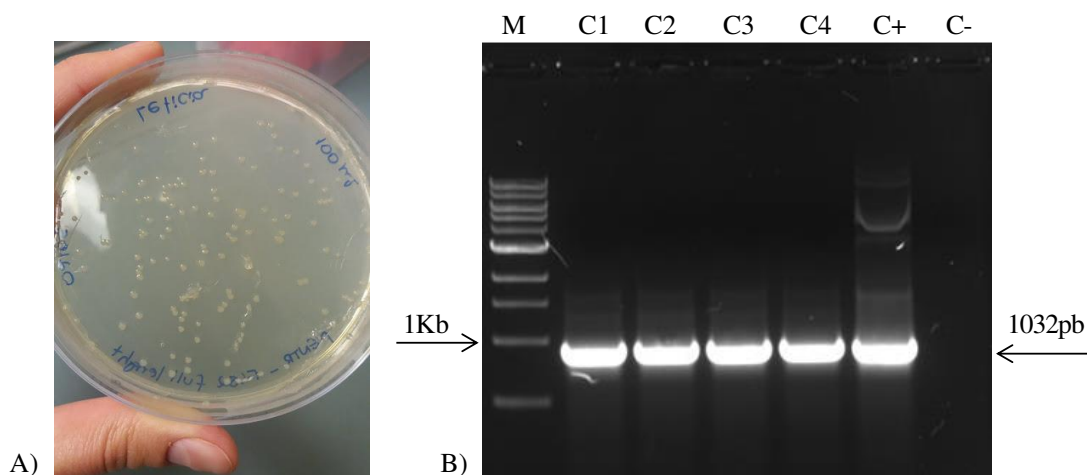


Figure 7: Representação da transformação dos vetores em *E. coli*. A) Regeneração de colônias transformadas em meio LB contendo canamicina. B) Gel de agarose 1% do PCR de colônia para confirmação da presença do transgene. M: marcador molecular; C+: controle positivo - vetor contendo o transgene; C-: mix de reação; C1-C4: colônias de *E. coli* testadas.

4.2.3 Desenvolvimento de plantas de *Arabidopsis* expressando os genes *LRR-RK*

A estirpe GV3101 de *Agrobacterium* foi eficientemente transformada via eletroporação com os quatro vetores binários e o vetor vazio. No gel de agarose (Figura 8) é observado um amplicon de 1032 pb nas colônias de *Agrobacterium* testadas, correspondente ao mesmo tamanho da banda amplificada no controle positivo. Uma colônia de cada construção foi utilizada para transformar o ecótipo WS-0 de *A. thaliana*.

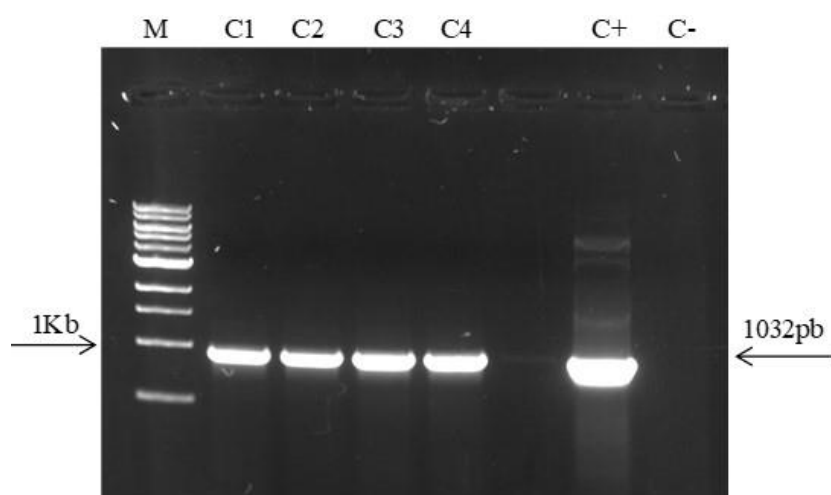


Figure 8: Representação do gel de agarose 1% referente à PCR de colônias de *Agrobacterium* transformadas com os vetores contendo os genes *CrLRR-RK*, *FLS2*, *CrLRR-RK:FLS2*, *FLS2:CrLRR-RK*. M: marcador molecular; C+: controle positivo - vetor contendo o transgene; C-: mix de reação; C1-C4: colônias de *Agrobacterium* testadas.

Cerca de 100 plantas foram transformadas com cada um dos vetores via *spray floral dip*. As primeiras sementes (T0) foram coletadas para seleção com herbicida BASTA (Figura 9). Até o momento, 50 plantas transformadas com o gene quimérico *FLS2:CrLRR-RK* (FC) e uma transformada com o vetor vazio (EV) foram selecionadas com herbicida e confirmadas por PCR (Figura 10). A seleção seguirá até a geração F4, onde serão obtidas plantas em homozigose para os transgenes.

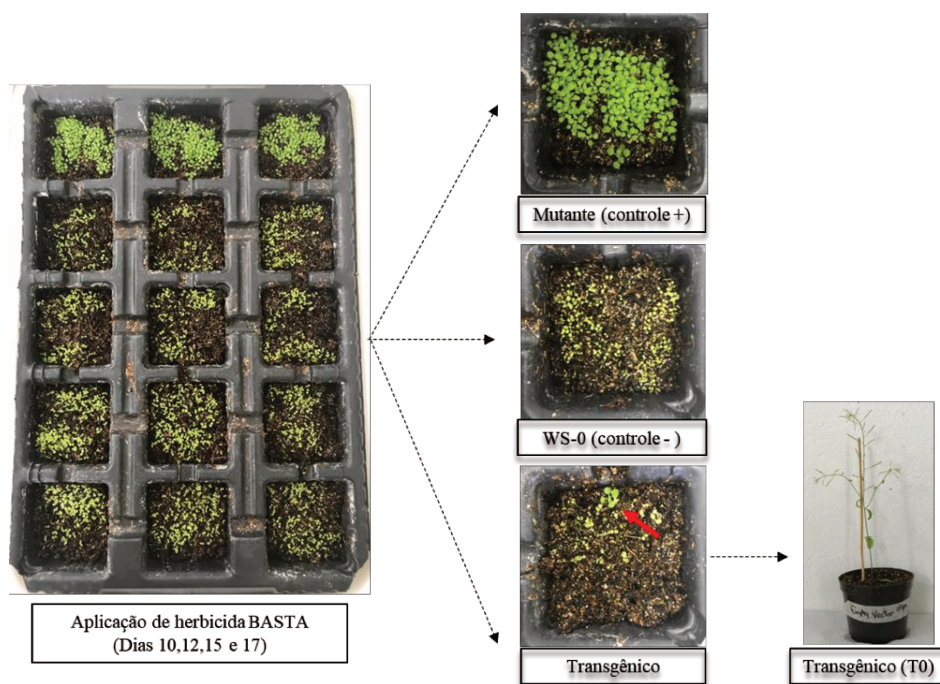


Figura 9: Representação da seleção com o herbicida Basta. As sementes são espalhadas na superfície do solo e 10 dias após a germinação, começa a primeira aplicação do herbicida. As plantas selecionadas são transferidas para novo pote para melhor desenvolvimento. O controle positivo utilizado nesse experimento é o mutante de Col-0 resistente ao BASTA (SAIL_691_C04) e o controle negativo são plantas WS-0, que é o ecótipo utilizado para transformação dos genes.

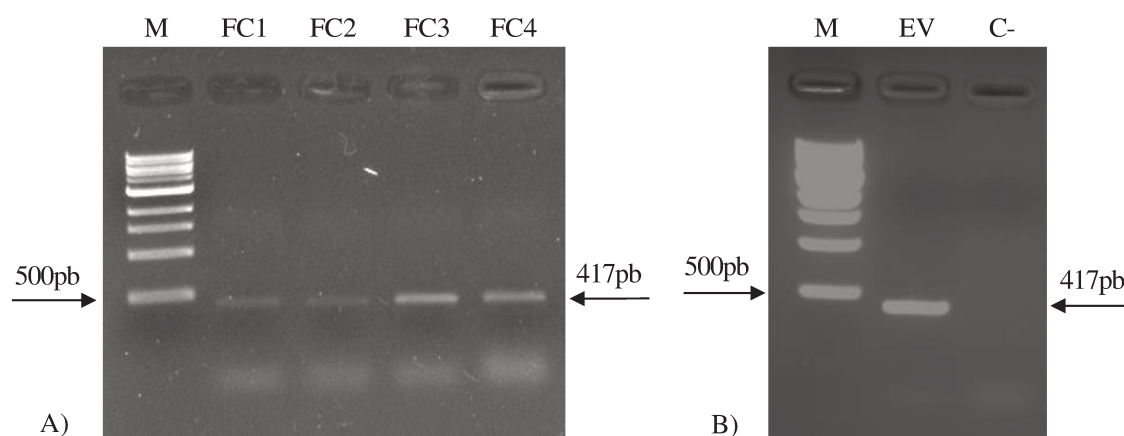


Figura 10: Gel de agarose 1% do PCR de confirmação das plantas transgênicas de *Arabidopsis* transformada com o vetor contendo o gene FLS2:CrLRR-RK (A) e o vetor vazio (B).

A geração de plantas de *Arabidopsis* com o gene *CrLRR-RK* nos permite avançar nos estudos para provar a funcionalidade deste receptor como um PRR de citros. Inicialmente, as plantas com o receptor quimérico FLS2:CrLRR-RK serão utilizadas para provar se o receptor possui domínio quinase ativo na presença do PAMP. Como o receptor FLS2 é capaz de reconhecer o peptídeo flg22, espera-se que o ecótipo WS-0 de *Arabidopsis* (sensível a flagelina) contendo o transgene seja capaz de ativar o sistema de defesa da planta em resposta à ligação do flg22 ao domínio extracelular de FLS2 (Figura 11). O gene FLS2 será utilizado como controle do experimento, uma vez que sua transferência para WS-0 restaura a função desse gene naturalmente mutado nesse ecótipo (Gómez-Gómez & Boller, 2000). Para verificar a ativação do sistema de defesa nessas plantas, o ensaio para detecção de ROS pode ser utilizado, uma vez que é uma das respostas mais rápidas da planta diante do ataque de patógeno (Roux et al., 2011).

Baseado na hipótese de que o receptor putativo CrLRR-RK é capaz de perceber PAMPs ainda desconhecidos, as plantas de *Arabidopsis* contendo tanto o receptor CrLRR-RK, quanto o receptor quimera CrLRR-RK:FLS2, serão utilizadas para busca de possíveis PAMPs reconhecidos pelo domínio extracelular de CrLRR-RK. No caso do receptor CrLRR-RK:FLS2, o domínio quinase proveniente de FLS2 garante a sinalização da resposta de defesa para dentro da célula vegetal (Figura 11). Para determinar possíveis PAMPs desse receptor, também podemos utilizar o ensaio ROS para verificar a ativação de defesa após o desafio com *X. fastidiosa* e outras bactérias patogênicas gram-negativas como *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae* e *Ralstonia solanacearum*. Caso a indução de PTI seja observada por acúmulo de ROS, pode-se considerar que os componentes *downstream* do reconhecimento do patógeno são conservados entre CrLRR-RK e FLS2 e que CrLRR-RK é um PRR de citros.

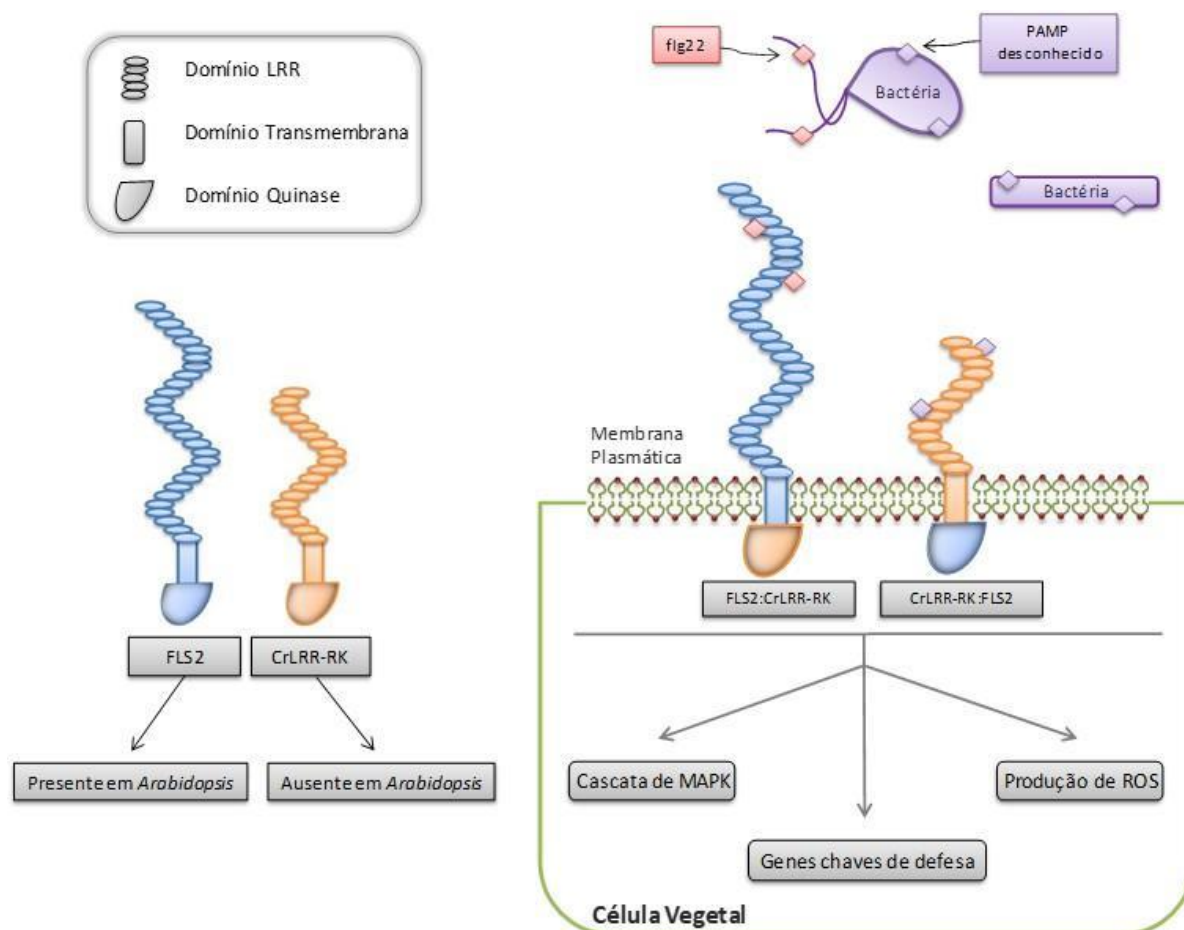


Figura 11: Receptores PRRs associados ao reconhecimento de PAMPs e sinalização de PTI em plantas. Após a percepção do PAMP no domínio extracelular dos receptores PRRs, o domínio quinase transfere o sinal para o interior da célula, o que leva a rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), ativação da cascata de MAP quinases, resultando em reprogramação transcricional de genes relacionados à defesa para estabelecer PTI. O receptor FLS2 é capaz de reconhecer o peptídeo flg22 (derivado do flagelo de bactérias) ao contrário do receptor putativo CrLRR-RK, que possui PAMP desconhecido. Espera-se que, *Arabidopsis* mutante para o gene *FLS2* (*fls2*⁻) que possua o receptor quimera FLS2:CrLRR-RK, tenha seu domínio quinase derivado de CrLRR-RK ativado em resposta à ligação do flg22 ao domínio extracelular de FLS2, confirmando a funcionalidade desse receptor putativo como um receptor do tipo quinase. Já as plantas de *Arabidopsis* (*fls2*⁻) contendo o gene *CrLRR-RK* e o receptor quimera CrLRR-RK:FLS2, podem ser utilizadas para busca de possíveis PAMPs capazes de se ligarem ao domínio extracelular de CrLRR-RK.

A utilização de receptores quimeras foi uma estratégia adotada em trabalhos anteriores envolvendo os receptores FLS2, EFR e Xa21. A partir das quimeras entre EFR e

Xa21 foi possível provar que Xa21 é funcional em *Arabidopsis*. O domínio quinase de Xa21 é capaz de ativar o sistema imune na planta em resposta ao desafio com elf18. Além disso, foi possível verificar que esses receptores recrutam componentes similares da sinalização de defesa, como BAK1 e BIK1 (Holton et al., 2015). As quimeras entre EFR e FLS2 também foram utilizadas para verificar a relação existente entre esses receptores e determinar quais subdomínios na proteína são importantes para o reconhecimento do PAMP e ativação dos receptores (Alberts et al., 2010).

4.3 Desenvolvimento de plantas de laranja doce expressando o gene *CrLRR-RK* para avaliação da resposta de defesa a patógenos bacterianos de citros

4.3.1 Obtenção e confirmação de plantas de laranja doce expressando *CrLRR-RK*

O vetor binário contendo o transgene foi eficientemente transformado na estirpe EHA105 de *A. tumefaciens*. Nota-se no gel de agarose que o par de primer utilizado na PCR amplificou uma região de 1608 pb nas colônias de *Agrobacterium* testadas (Figura 12), correspondendo ao mesmo tamanho da banda amplificada no controle positivo para o gene *CrLRR-RK*.

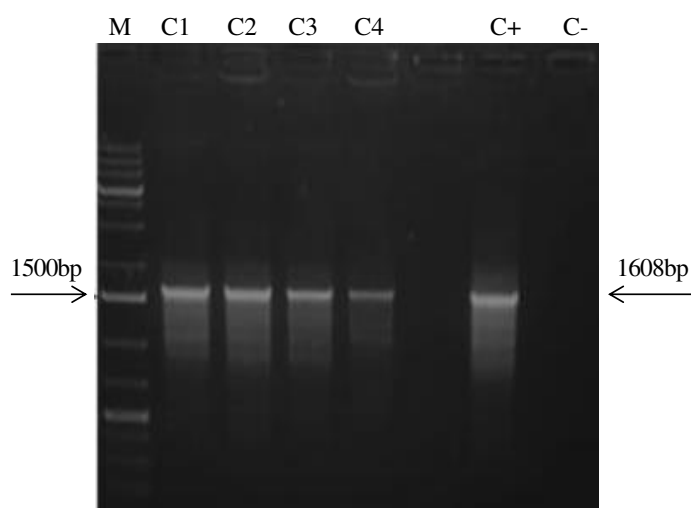


Figura 12: Gel de agarose 1% referente à PCR de colônias de *Agrobacterium* transformada com o vetor contendo o gene *CrLRR-RK*. M: marcador molecular; C+: controle positivo - vetor contendo o transgene; C-: mix de reação; C1-C4: Colônias de *Agrobacterium* testadas.

Foram realizados nove experimentos de transformação em três variedades de laranja doce (Hamlin, Pineapple e Valência) e em todos eles foram obtidos brotos regenerados em meio de seleção. Na Tabela 2 são apresentados detalhes de cada experimento de

transformação e o número de brotos confirmados pelo ensaio GUS e PCR. Com base nessas informações, a eficiência de transformação foi calculada para cada experimento, que variou entre 0,97-13%. Apesar de alguns experimentos apresentarem brotos previamente confirmados como positivos no ensaio GUS, alguns deles foram considerados negativos pela PCR, indicando a presença de brotos quimeras nesta etapa (Figura 13).

Tabela 2: Experimentos de transformação realizados em variedade de laranja doce (Hamlin, Pineapple e Valência) com o gene *CrLRR-RK*.

Experimento	Variedade	Nº de explantes	Nº de brotos	Brotos Gus (+)	Brotos PCR (+)/ Plantas avaliadas	Eficiência de transformação (%)*
1	Pineapple	300	509	39	6/14	13%
1	Hamlin	87	89	2	1/2	2,24%
2		350	183	29	6/8	8,28%
3		225	64	12	4/12	5,33%
1	Valência	248	50	8	0/1	3,22%
2		255	8	3	0/2	1,17%
3		205	302	2	1/2	0,97%
4		275	98	5	3/4	1,82%
5		291	113	4	1/5	1,37%

*A eficiência de transformação foi calculada com base no número de plantas GUS positivo pelo número de explantes infectados.

Em citros, mesmo após a enxertia, é possível encontrar plantas quimeras, que são plantas que possuem tecido com células de diferentes constituições genéticas. Para evitar problemas futuros na seleção dos clones e avaliação dos eventos transgênicos, o ensaio GUS foi realizado em pelo menos três partes diferentes da planta, seguido de PCR. Depois dessa segunda confirmação, foram estabelecidas quais plantas foram utilizadas como matrizes para a produção de clones, para utilização em experimentos posteriores. Após essa avaliação, foram confirmados seis eventos de Hamlin (H13, H44, H81, H91, H163 e H208) (A), três de Pineapple (P37, P102 e P200) (B) e cinco de Valência (V58, V171, V172, V174 e V191) (C) que foram enxertados em porta-enxerto de limão-cravo (Figura 13). O desenvolvimento dos brotos desde a cultura de tecidos até o estabelecimento das plantas matrizes está representado na Figura 14.

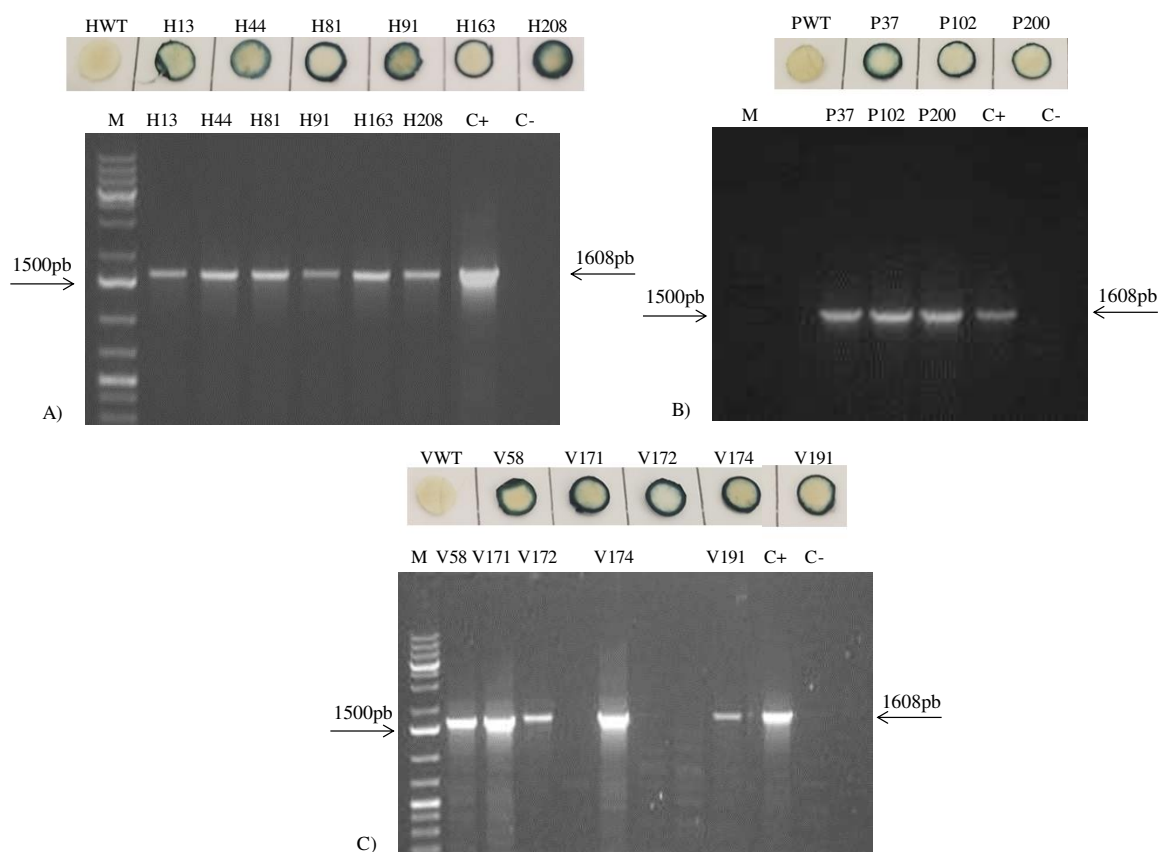


Figura 13: Gel de agarose 1% referente à PCR de confirmação dos eventos transgênicos de Hamlin (H13, H44, H81, H91, H163 e H208) (A), Pineapple (P37, P102 e P200) (B) e Valência (V58, V171, V172, V174 e V191) (C). C+: controle positivo - vetor contendo o transgene; C-: planta WT.

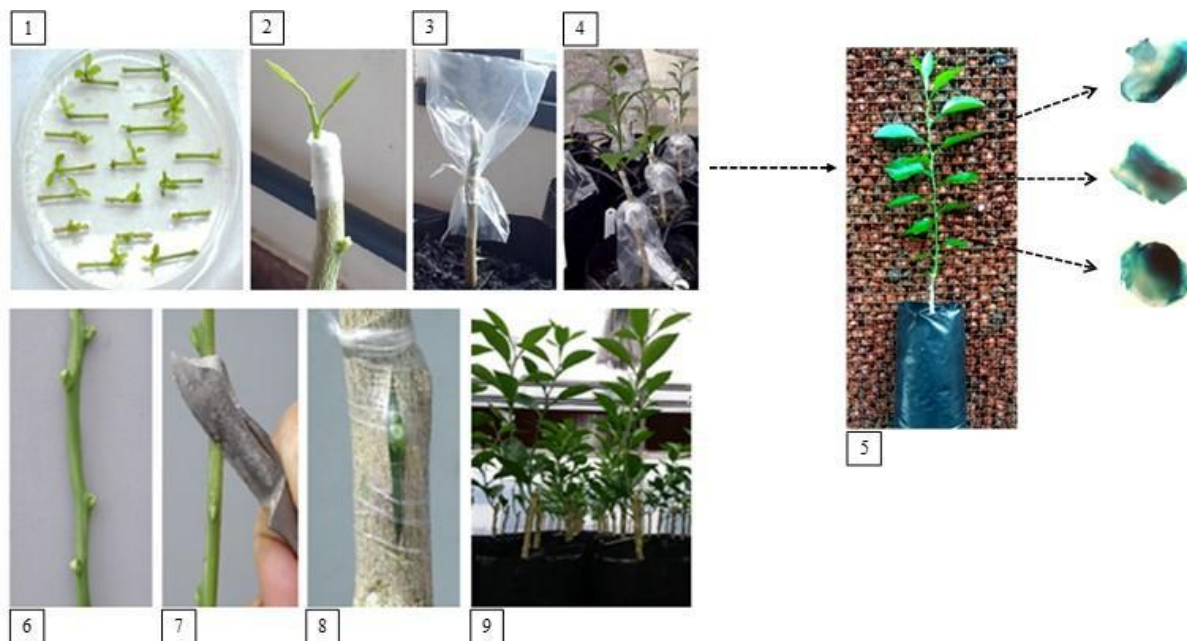


Figura 14: Representação das etapas de transformação em citros: 1) Regeneração de brotos em meio de cultura contendo canamicina; 2) Brotos positivos quanto a presença do transgene, testados pelo ensaio GUS e PCR, foram enxertados em porta-enxerto Limão Cravo; 3) Aclimação dos brotos enxertados em casa de vegetação; 4-5) Novos ensaios GUS e PCR nas plantas matrizes para verificar a existência de plantas quimeras. Pelo menos três partes diferentes da planta foram avaliadas; 6-7) Seleção e retirada de borbulhas para nova enxertia; 8) Enxertia das borbulhas em porta-enxerto para produção de clones; 9) Clones derivados da planta matriz em estágio de desenvolvimento ideal para os ensaios de desafio com patógenos.

Depois de definidas as plantas matrizes, estas foram avaliadas quanto a expressão do gene *CrLRR-RK*. Foi confirmada a superexpressão do transgene em todos os eventos avaliados (Figura 15). A expressão relativa foi variável entre os eventos e dentro de cada variedade. Podemos destacar H81, P37 e V58 como as que menos expressam o transgene e H208, P200 e V191 com maiores níveis de transcritos (Figura 15).

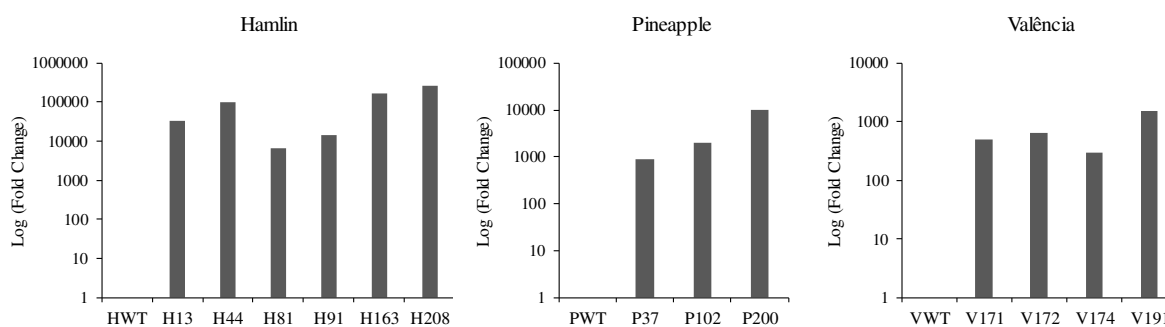


Figura 15: PCR quantitativo para avaliação da expressão do transgene nos eventos de laranja doce transformados com o gene *CrLRR-RK*. A expressão relativa do transgene foi obtida em comparação com os eventos de menor expressão gênica de cada variedade (H8, P31 e V58), que foram utilizadas como calibrador.

4.3.2 Ensaios de desafio com a bactéria *X. fastidiosa*

A partir de cada planta matriz, foram produzidos 15 clones de cada evento transgênico de laranja doce e de plantas WT que foram utilizadas como controle no experimento. Vale ressaltar que as plantas controles também são provenientes da cultura de tecidos, uma vez que, plantas oriundas da cultura de tecido apresentam crescimento bacteriano e desenvolvimento da doença mais acelerada quando comparada a plantas derivadas da propagação vegetativa (dados não mostrados).

Para o ensaio com *X. fastidiosa* em casa de vegetação, foram desafiados 15 clones de cada evento, incluindo o WT. As plantas foram inoculadas duas vezes com a suspensão bacteriana, com intervalo de duas semanas. A grande quantidade de clones inoculados com a bactéria é para garantir o maior número possível de réplicas biológicas no experimento, uma vez que, a eficiência de inoculação de *X. fastidiosa* é baixa. Vale ressaltar também que o procedimento de inoculação da bactéria em meses com altas temperatura garante maior eficiência na colonização e desenvolvimento dos sintomas de CVC (Almeida et al., 2001).

Dois meses após a inoculação o pecíolo da folha acima do ponto de inoculação foi coletado para extração de DNA total e teste de diagnóstico da bactéria por PCR. O par de primer utilizado amplificou uma região de 733 pb no genoma da bactéria, equivalente ao controle positivo (Figura 16). Na Tabela 3 encontram-se a relação de plantas inoculadas e diagnosticadas com *X. fastidiosa*, assim como a quantidade de plantas sintomáticas que foram identificadas um ano após inoculação. Alguns eventos transgênicos (H44, H208, P102 e P200) apresentaram problemas de desenvolvimento em seus clones e foram eliminadas do experimento, não seguindo para a avaliação da doença. Muitos dos eventos PCR positivo

apresentaram reduzida severidade da CVC comparada ao WT. Esses eventos ainda estão em análise e serão futuramente selecionados para os estudos posteriores do potencial em perceber os PAMPs e ativação de PTI em citros.

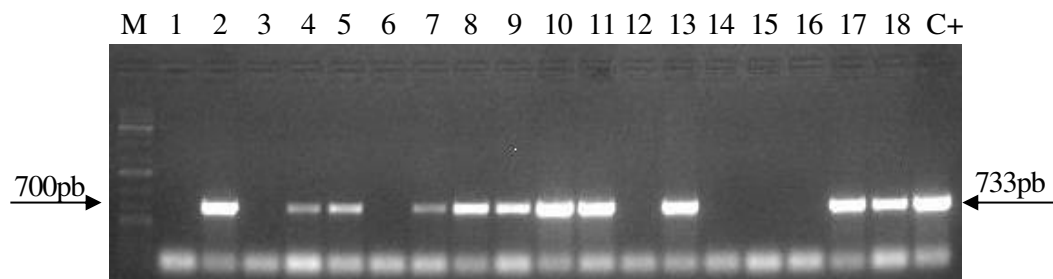


Figura 16: Representação do gel de agarose 1% referente à PCR de diagnóstico de *X. fastidiosa* dos eventos transgênicos de laranja doce e das plantas controle. C+: controle positivo – planta previamente diagnosticada com *X. fastidiosa*; 1-18: plantas avaliadas para a presença da bactéria.

Tabela 3: Plantas de laranja doce transformadas com o gene *CrLRR-RK* que foram confirmadas quanto a presença da bactéria por PCR e que apresentam sintomas um ano após a inoculação.

Planta	Plantas PCR+	Plantas sintomáticas
PWT	9	4
P37	11	1
P102	-	-
P200	-	-
VWT	10	5
V171	8	1
V172	10	3
V174	8	5
V191	7	2
HWT	12	3
H13	8	2
H44	-	-

H81	8	4
H91	13	4
H163	11	2
H208	-	-

5. Perspectivas

No Capítulo II foi caracterizado estruturalmente e funcionalmente o candidato a receptor CrLRR-RK. Este receptor putativo altamente expresso em *C. reticulata* pode estar diretamente relacionado ao reconhecimento de PAMPs derivado de *X. fastidiosa*, como evidenciado pelos dados de RNAseq (Rodrigues et al., 2013) e as análises *in silico* realizadas nesse trabalho.

A transferência do gene *CrLRR-RK* e dos receptores quimeras para *Arabidopsis* possibilitará comprovar a funcionalidade desse receptor, assim como buscar seus possíveis ligantes. Ainda, trabalhos envolvendo a regulação do sistema downstream do reconhecimento do patógeno e dos subdomínios essenciais para a função do receptor poderão ser realizados utilizando essas plantas. O gene *CrLRR-RK* também foi transferido para variedade de laranja doce para verificar seu potencial em conferir maior resistência a patógenos bacterianos de citros, uma vez que, esse tipo de receptor pode conferir resistência em amplo espectro. Um experimento já foi desafiado com a bactéria *X. fastidiosa* (agente causador da CVC) e continuará sendo conduzido para avaliação da incidência e severidade da CVC. Além disso, a população bacteriana também será verificada para determinar a capacidade de colonização nas plantas transgênicas em relação ao controle WT.

As plantas transgênicas de citros também poderão ser avaliadas quanto a tolerância ao cancro cítrico. O experimento deverá ser inicialmente conduzido pelo método de infiltração em folhas destacadas (Caserta et al., 2014) para seleção dos eventos com algum nível de tolerância ao cancro cítrico. Depois, experimentos em casa de vegetação deverão ser realizados para avaliar a incidência e severidade do cancro cítrico em um cenário mais próximo das condições de campo, como realizado por Belasque-Júnior et al. (2005). Alguns trabalhos prévios mostraram que a transferência dos receptores PRRs tais como FLS2 e Xa21 para espécies de citros conferiram resistência em amplo espectro a *X. citri* (Mendes et al., 2010; Li et al., 2014; Hao et al., 2015; Shi et al., 2016; Omar et al., 2018).

A utilização futura de plantas transgênicas de citros e o uso da cisgenia utilizando receptores PRR são abordagens promissoras para suportar os programas de melhoramento.

Assim, a transferência desse receptor para espécies suscetíveis de citros é uma estratégia que tem grande potencial em conferir resistência de amplo espectro a doenças bacterianas de citros.

6. Referências

- Albert M, Jehle AK, Mueller K, Eisele C, Lipschis M, Felix G. 2010.** *Arabidopsis thaliana* pattern recognition receptors for bacterial elongation factor tu and flagellin can be combined to form functional chimeric receptors. *The journal of biological chemistry* **285**: 19035–19042.
- Almeida RPP, Pereira EF, Purcell AH, Lopes JRS. 2001.** Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Disease* **85**: 382–386.
- Belasque Júnior J, Bassanezi RB, Spósito MB, Ribeiro LM, Jesus Júnior WC, Amorim L. 2005.** Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. *Fitopatologia Brasileira* **30**: 387–393.
- Boller T, Felix G. 2009.** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology* **60**: 379–406.
- Boutrot F, Zipfel C. 2017.** Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review Phytopathology* **55**: 257–286.
- Caserta R, Picchi SC, Takita MA, Tomaz JP, Pereira WEL, Machado MA, Ionescu M, Lindow S, De Souza AA. 2014.** Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in citrus disrupts signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and thereby its virulence. *MPMI* **27**: 1241–1252.
- Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rossetti V & Bové JM. 1993.** Culture and serological detection of *Xylella fastidiosa*, the xylem-limited bacterium associated with citrus variegated chlorosis disease. *Current Microbiology* **27**: 137–142.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G. 2006.** The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465–476.
- Chung MH, Chen MK, Pan SM. 2000.** Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Research* **9**: 471–476.
- Coletta-Filho HD, Pereira EO, Souza AA, Takita MA, Cristofani-Yaly M, Machado MA. 2007.** Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange x Murcott tangor. *Plant Pathology* **56**: 661–668.
- Dardick C, Schwessinger B, Ronald P. 2012.** Non-arginine-aspartate (non-RD) kinases are associated with innate immune receptors that recognize conserved microbial signatures. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 358–366.
- Diévarit A, Gilbert N, Droc G, Attard A, Gourgues M, Guiderdoni E, Périn C. 2011.** Leucine-rich repeat receptor kinases are sporadically distributed in eukaryotic genomes. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 367.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990.** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* **12**: 13–15.

- Fischer I, Diévar A, Droc G, Dufayard J-F, Chantret N. 2016.** Evolutionary dynamics of the Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase (LRR-RLK) subfamily in angiosperms. *Plant Physiology* **170**: 1595–1610.
- Gomez-Gomez L, Boller T. 2000.** FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011.
- Hao G, Pitino M, Duan Y, Stover E. 2015.** Reduced susceptibility to *Xanthomonas citri* in transgenic citrus expressing the FLS2 receptor from *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **29**: 132–142.
- Hartung JS, Beretta MJG, Brlansky RH, Spisso J, Lee RF. 1994.** Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **84**: 591–597.
- Holton N, Nekrasov V, Ronald PC, Zipfel C. 2015.** The phylogenetically-related pattern recognition receptors EFR and XA21 recruit similar immune signaling components in monocots and dicots. *PLoS Pathogens* **11**: e1004602p
- Hwang SG, Kim DS, Jang CS. 2011.** Comparative analysis of evolutionary dynamics of genes encoding leucine-rich repeat receptor-like kinase between rice and *Arabidopsis*. *Genetica* **139**: 1023–1032.
- Krügner R, Lopes MTVC, Santos JS, Beretta MJG, Lopes JRS. 2000.** Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. *Anais 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, Campinas, SP, p. 423.
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. 2004.** The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**: 3496–3507.
- Laranjeira FF, Pompeu Jr J, Harakava R, Figueiredo JO, Carvalho AS, Coletta-Filho HD. 1998.** Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* **23**: 147–154.
- Li D, Xiao X, Guo W. 2014.** Production of transgenic anliucheng sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with Xa21 gene for potential canker resistance. *Journal of Integrative Agriculture* **13**: 2370–2377.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* **25**: 402–408.
- Magalhães DM, Scholte LLS, Silva NV, Oliveira GC, Zipfel C, Takita MA, De Souza AA. 2016.** LRR-RLK family from two *Citrus* species: genome-wide identification and evolutionary aspects. *BMC Genomics* **17**: 623.
- Mendes BMJ, Cardoso SC, Boscariol-Camargo RL, Cruz RB, Mourão Filho FAA, Bergamin Filho A. 2010.** Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice Xa21 gene. *Plant Pathology* **59**: 68–75.
- Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC, Stall RE. 1994.** Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* **84**: 456–461.
- Omar AA, Murata MM, El-Shamy HA, Graham JH, Grosser JW. 2018.** Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing Xa21 from rice. *Transgenic Research*. doi:10.1007/s11248-018-0065-2.

- Roberto SR, Coutinho A, Lima JEOD, Miranda VS, Carlos EF. 1996.** Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. *Fitopatologia Brasileira* **21**: 517–518.
- Roberto SR, Farias PRS, Bergamin Filho A. 2002.** Geostatistical analysis of spatial dynamic of Citrus Variegated Chlorosis. *Fitopatologia Brasileira* **27**: 599–604.
- Rodrigues CM, De Souza AA, Takita MA, Kishi LT, Machado MA. 2013.** RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. *BMC Genomics* **14**: 676.
- Rossetti V, De Negri JD. 1990.** Clorose variegada dos citros: revisão. *Laranja* **11**: 1–14
- Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Tor M, Vries S, Zipfel C. 2011.** The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell* **23**: 2440–2455.
- Pruitt RN, Schwessinger B, Joe A, Thomas N, Liu F, et al. 2015.** The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a gram-negative bacterium. *Science Advances* **1**: e1500245.
- Pruitt RN, Joe A, Zhang W, Feng W, Stewart V, Schwessinger B, Dinneny JR, Ronald PC. 2017.** A microbially derived tyrosine-sulfated peptide mimics a plant peptide hormone. *New Phytologist* **215**: 725–736.
- Sakamoto T, Deguchi M, Brustolini OJB, Santos AA, Silva FF, Fontes EPB. 2012.** The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biology* **12**: 229.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Fatmi MB, Chang CJ. 2004.** *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 290–300.
- Schuenzel EL, Scally M, Stouthamer R, Nunney L. 2005.** A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3832–3839.
- Schwessinger B, Bahar O, Thomas N, Holton N, Nekrasov V, Ruan D, Canlas PE, Daudi A, Petzold CJ, Singan VR, Kuo R, Chovatia M, Daum C, Heazlewood JL, Zipfel C, Ronald PC. 2015.** Transgenic expression of the dicotyledonous pattern recognition receptor EFR in rice leads to ligand-dependent activation of defense responses. *PLOS Pathogens* **11**: e1004809
- Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA. 2016.** A survey of *FLS2* genes from multiple citrus species identifies candidates for enhancing disease resistance to *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *Horticulture Research* **3**: 80.
- Shiu S, Karlowski WM, Pan R, Tzeng Y, Mayer KFX, Li W. 2004.** Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell* **6**: 1220–1234.
- da Silva AC, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, et al. 2002.** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459–462.
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, et al. 1995.** A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**: 1804–1806.

De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Campos MA, Teixeira JEC, Targon MLPN, Carlos EF, Ravasi JR, Fischer CN, Machado MA. 2007. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetic Molecular Biology* **30**: 965–971.

De Souza AA, Takita MA, Amaral AM, Coletta-Filho HD, Machado MA. 2009. Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent de citrus variegated chlorosis. *Tree and Forestry Science Biotechnology* **2**: 957–964.

Yamamoto PT, Roberto SR, Pria Júnior WD, Felipe MR, Miranda VS, Teixeira DC, Lopes JRS. 2002. Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. *Summa Phytopathologica* **28**: 178–181.

Zan Y, Ji Y, Zhang Y, Yang S, Song Y, Wang J. 2013. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of populus leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes. *BMC Genomics* **14**: 318.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749–760.

7. Conclusão Geral

No Capítulo I, foram desenvolvidas variedades de laranja doce expressando o gene que codifica o receptor EFR de *Arabidopsis*. O sistema de percepção EF-Tu-EFR possibilitou o reconhecimento em amplo espectro de bactérias patogênicas de citros, *X. citri* e *X. fastidiosa*, que foi capaz de ativar o sistema imune nessa espécie perene. A ativação do sistema de defesa culminou no aumento gradual da resistência ao cancro cítrico e CVC em alguns eventos transgênicos em relação ao WT.

No Capítulo II, a análise *in silico* mostrou que o gene *CrLRR-RK* altamente expresso em tangerina (espécie resistente a CVC) codifica possivelmente um receptor PRR capaz de reconhecer patógeno. Foi mostrado que existem modificações estruturais em seu ortólogo CsLRR-RK que podem ter sido suficientes para alterar a percepção de PAMPs provenientes de *X. fastidiosa* e ativar o sistema de defesa em laranja doce (espécie suscetível). Para provar a funcionalidade desse receptor e tentar obter maior resistência a CVC em genótipos suscetíveis a doença, plantas de *Arabidopsis* e laranja doce expressando o gene *CrLRR-RK* foram produzidas.

8. Referências

- Albert M, Jehle AK, Mueller K, Eisele C, Lipschis M, Felix G. 2010.** *Arabidopsis thaliana* pattern recognition receptors for bacterial elongation factor tu and flagellin can be combined to form functional chimeric receptors. *The journal of biological chemistry* **285**: 19035–19042.
- Almeida RPP, Nunney L. 2015.** How do plant diseases caused by *Xylella fastidiosa* emerge? *Plant Disease* 99: 1457–1467.
- Almeida RPP, Pereira EF, Purcell AH, Lopes JRS. 2001.** Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. *Plant Disease* **85**: 382–386.
- Alva AK, Graham JH, Anderson CA. 1995.** Soil pH and copper effects on young ‘Hamlin’ orange trees. *Soil Science Society of America Journal* 59: 481–487.
- Bardoel BW, van der Ent S, Pel MJC, Tommassen J, Pieterse CMJ, van Kessel KPM, van Strijp JAG. 2011.** *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathogens* **7**: e1002206.
- Behlau F, Amorim L, Belasque Júnior J, Bergamin Filho A, Leite Júnior RP, Graham JH, Gottwald TR. 2010.** Annual and polyetic progression of citrus canker on trees protected with copper sprays. *Plant Pathology* 59: 1031–1036.
- Behlau F, Canteros BI, Minsavage GV, Jones JB, Graham JH. 2011.** Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Applied Environmental Microbiology* 77: 4089–4096.
- Behlau F, Scandelai LHM, da Silva Junior GJ, Lanza FE. 2017.** Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees. *Crop Protection* 94: 185–191.
- Belasque Júnior J, Bassanezi RB, Spósito MB, Ribeiro LM, Jesus Júnior WC, Amorim L. 2005.** Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. *Fitopatologia Brasileira* **30**: 387–393.
- Boller T, Felix G. 2009.** A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology* 60: 379–406.
- Boutrot F, Zipfel C. 2017.** Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annual Review Phytopathology* **55**: 257–286.
- Boschi F, Schwartzman C, Murchio S, Ferreira V, Siri MI, Galvan GA, Smoker M, Stransfeld L, Zipfel C, Vilaró FL, Dalla-Rizza M. 2017.** Enhanced bacterial wilt resistance in potato through expression of *Arabidopsis* EFR and introgression of quantitative resistance from *Solanum commersonii*. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2017.01642.

- Bové JM. 2014.** Huanglongbing or yellow shoot, a disease of Gondwanan origin: will it destroy citrus worldwide? *Phytoparasitica* **42**: 579–583.
- Bové JM; Ayres AJ. 2007.** Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. *IUBMB Life* **59**: 346–354.
- Brunings AM, Gabriel DW. 2003.** *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* **4**: 141–157.
- Carvalho AS. 2003.** Regulamentação atual da Agência de Defesa Agropecuária para a produção, estocagem, comércio, transporte e plantio de mudas cítricas no Estado de São Paulo. *Laranja* **24**: 199–239.
- Carvalho S, de Carvalho Nunes WM, Belasque-Júnior J, Machado MA, Croce-Filho J, Bock CH, Abdo Z. 2015.** Comparison of resistance to asiatic citrus canker among different genotypes of citrus in a long-term canker-resistance field screening experiment in Brazil. *Plant Disease* **99**: 207–218.
- Caserta R, Picchi SC, Takita MA, Tomaz JP, Pereira WEL, Machado MA, Ionescu M, Lindow S, De Souza AA. 2014.** Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in citrus disrupts signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and thereby its virulence. *MPMI* **27**: 1241–1252.
- Caserta R, Takita MA, Targon ML, Rosselli-Murai LK, Souza AP, Peroni L, Stach-Machado DR, Andrade A, Labate CA, Kitajima EW, Machado MA, De Souza AA. 2010.** Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4250–4259.
- Caserta R, Teixeira-Silva NS, Granato LM, Dorta SO, Rodrigues CM, Mitre LK, Yochikawa JTH, Nascimento CA, Souza-Neto RR, Takita MA, Boscariol-Camargo RL, Machado MA, De Souza AA. 2020.** Citrus Biotechnology: What have we done to improve disease resistance in such important crop? *Biotechnology Research & Innovation Journal CEPEA*. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>. Acesso em 05 de novembro de 2019.
- Chang CJ, Garnier M, Zreik L, Rossetti V & Bové JM. 1993.** Culture and serological detection of *Xylella fastidiosa*, the xylem-limited bacterium associated with citrus variegated chlorosis disease. *Current Microbiology* **27**: 137–142.
- Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T, Felix G. 2006.** The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465–476.
- Chung MH, Chen MK, Pan SM. 2000.** Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Research* **9**: 471–476.

- Coletta-Filho HD, Targon MLPN, Takita MA, De Negri JD, Pompeu JJ, Machado MA. 2004.** First Report of the Causal Agent of Huanglongbing (“Candidatus *Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. *Plant Disease* **88**: 1382.
- Coletta-Filho HD, De Souza AA. 2014.** Avanços no conhecimento sobre a clorose variegada dos citros: uma abordagem sobre os diferentes componentes do patossistema. *Citrus R&T*. doi: 10.5935/2236-3122.20140003.
- Coletta-Filho HD, Pereira EO, De Souza AA, Takita MA, Cristofani-Yale M, Machado MA. 2007.** Analysis of resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange X Murcott tangor. *Plant Pathology* **56**: 661–668.
- Dardick C, Schwessinger B, Ronald P. 2012.** Non-arginine-aspartate (non-RD) kinases are associated with innate immune receptors that recognize conserved microbial signatures. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 358–366.
- De La Fuente L, Burr TJ, Hoch HC. 2007.** Mutations in type I and type IV pilus biosynthetic genes affect twitching motility rates in *Xylella fastidiosa*. *Journal Bacteriology* **189**: 7507–7510.
- Diévert A, Gilbert N, Droc G, Attard A, Gourgues M, Guiderdoni E, Périn C. 2011.** Leucine-rich repeat receptor kinases are sporadically distributed in eukaryotic genomes. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 367.
- Doyle JJ; Doyle, JL. 1990.** A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* **12**: 13–15.
- Dow JM, Daniels MJ. 2000.** *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* **17**: 263–271.
- Delbianco A, Czwieniczek E, Pautasso M, Kozelska S, Monguidi M, Stancanelli G. 2018.** A new resource for research and risk analysis: the updated European Food Safety Authority database of *Xylella* spp. host plant species. *Phytopathology*. doi:10.1094/phyto-09-18-0343a
- Embrapa.** Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/174066/1/4942.pdf>. Acesso em 05 de novembro de 2019.
- Fan J, He Z, Ma LQ, Stoffella PJ. 2011.** Accumulation and availability of copper in citrus grove soils as affected by fungicide application. *Journal of Soils and Sediments* **11**: 639–648.
- Fischer I, Diévert A, Droc G, Dufayard J-F, Chantret N. 2016.** Evolutionary dynamics of the Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase (LRR-RLK) subfamily in angiosperms. *Plant Physiology* **170**: 1595–1610.

Fundecitros. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br>. Acesso em 05 de novembro de 2019.

Furukawa T, Inagaki H, Takai R, Hirai H, Che FS. 2014. Two distinct EF-Tu epitopes induce immune responses in rice and *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **27**: 113–124.

Gochez AM, Huguet-Tapia JC, Minsavage GV, Shantaraj D, Jalan N, Strauß A, et al. 2018. Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. *BMC Genomics* **19**:16.

Gomez-Gomez L, Boller T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**: 1003–1011.

Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS. 2002. Citrus canker: The pathogen and its impact. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

Graham JH, Gottwald TR, Cubero J, Achor DS. 2004. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology* **5**: 1–15.

Graham JH, Leite Júnior RP, Yonce HD, Myers M. 2008. Streptomycin controls citrus canker on sweet orange in Brazil and reduces risk of copper burn on grapefruit in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **121**: 118–123.

Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Glawischnig E, Lee J, Felix G, Nürnberger T. 2007. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 32338–32348.

Halbert SE. 2005. The discovery of huanglongbing in Florida. Proceedings Of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, Florida Citrus Mutual, Orlando 2005, H-3.

Hao G, Pitino M, Duan Y, Stover E. 2015. Reduced susceptibility to *Xanthomonas citri* in transgenic citrus expressing the FLS2 receptor from *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **29**: 132–142.

Hartung JS, Beretta MJG, Brlansky RH, Spisso J, Lee RF. 1994. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **84**: 591–597.

- Helft L, Reddy V, Chen X, Koller T, Federici L, Fernández-Recio J, Gupta R, Bent A. 2011.** LRR conservation mapping to predict functional sites within protein leucine-rich repeat domains. *PLoS ONE* **6**: e21614.
- Helft L, Thompson M, Bent AF. 2016.** Directed Evolution of FLS2 towards Novel Flagellin Peptide Recognition. *PLoS ONE* **11**: e0157155.
- Hind SR, Strickler SR, Boyle PC, Dunham DM, Bao Z, O'Doherty IM, Baccile JA, Hoki JS, Viox EG, Clarke CR, Vinatzer BA, Schroeder FC, Martin GB. 2016.** Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nature Plants* **2**: 16128.
- Holton N, Nekrasov V, Ronald PC, Zipfel C. 2015.** The phylogenetically-related pattern recognition receptors EFR and XA21 recruit similar immune signaling components in monocots and dicots. *PLoS Pathogens* **11**: e1004602
- Hwang SG, Kim DS, Jang CS. 2011.** Comparative analysis of evolutionary dynamics of genes encoding leucine-rich repeat receptor-like kinase between rice and *Arabidopsis*. *Genetica* **139**: 1023–1032.
- Ionescu M, Zaini PA, Baccari C, Tran S, da Silva AM, Lindow SE. 2014.** *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *PNAS* **111**: 3910–3918.
- Katsuragi Y, Takai R, Furukawa T, Hirai H, Morimoto T, Katayama T, Murakami T, Che FS. 2015.** CD2-1, the C-terminal region of flagellin, modulates the induction of immune responses in rice. *Molecular Plant Microbe Interactions* **28**: 648–658.
- Khalaf A, Moore GA, Jones JB, Gmitter JFG. 2007.** New insights into the resistance of Nagami kumquat to canker disease. *Physiology Molecular Plant Pathology* **71**: 240–250.
- Krügner R, Lopes MTVC, Santos JS, Beretta MJG, Lopes JRS. 2000.** Transmission efficiency of *Xylella fastidiosa* to citrus by sharpshooters and identification of two new vector species. *Anais 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, Campinas, SP, p. 423.
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G. 2004.** The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**: 3496–3507.
- Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz B, Jones, JDG, Zipfel C. 2010.** Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology* **28**: 365–369.

- Laranjeira FF, Pompeu Jr J, Harakava R, Figueiredo JO, Carvalho AS, Coletta-Filho HD. 1998.** Cultivares e espécies cítricas hospedeiras de *Xylella fastidiosa* em condições de campo. *Fitopatologia Brasileira* **23**: 147–154.
- Li Y, Hao G, Galvani CD, Meng Y, Fuente L, Hoch HC, Burr TJ. 2007.** Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation, and cell-cell aggregation. *Microbiology* **53**: 719–726.
- Li D, Xiao X, Guo W. 2014.** Production of transgenic anliucheng sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) with *Xa21* gene for potential canker resistance. *Journal of Integrative Agriculture* **13**: 2370–2377.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lu F, Wang H, Wang S, Jiang W, Shan C, Li B, Yang J, Zhang S, Sun W. 2015.** Enhancement of innate immune system in monocot rice by transferring the dicotyledonous elongation factor Tu receptor EFR. *Journal of Integrative Plant Biology* **57**: 641–652.
- Magalhães DM, Scholte LLS, Silva NV, Oliveira GC, Zipfel C, Takita MA, De Souza AA. 2016.** LRR-RLK family from two *Citrus* species: genome-wide identification and evolutionary aspects. *BMC Genomics* **17**: 623.
- Magalhães, D. M.** Análise filogenética de LRR-RLKs em *Citrus* e o envolvimento do receptor EF-Tu no reconhecimento de *Xylella fastidiosa*. 2016. 156 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade de Campinas, Campinas, Sp.
- Matsumoto A, Huston SL, Killiny N, Igo MM. 2012.** XatA, an AT-1 autotransporter important for the virulence of *Xylella fastidiosa* Temecula1. *Microbiology Open* **1**: 33–45.
- Mendes BMJ, Cardoso SC, Boscariol-Camargo RL, Cruz RB, Mourao Filho FAA, Bergamin Filho A. 2010.** Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. *Plant Pathology* **59**: 68–75.
- Mendonça LBP, Zambolim L, Badel JL. 2017.** Bacterial citrus diseases: major threats and recent progress. *Journal Bacteriol Mycol Open Access* **5**: 340–350.
- Moreira LM, Souza RF, Digiampietri LA, Silva AC, Setubal JC. 2005.** Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. *OMICS* **9**: 43–76.
- Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite RMVBC, Stall RE. 1994.** Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* **84**: 456–461.

- Nascimento R, Gouran H, Chakraborty S, Gillespie HW, Almeida-Souza HO, Tu A, et al. 2016.** The type II secreted lipase/esterase LesA is a key virulence factor required for *Xylella fastidiosa* pathogenesis in grapevines. *Sci Rep.* 2016; 6: 18598.
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JD. 2004.** The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology* 135: 1113–1128.
- Newman KL, Almeida RP, Purcell AH, Lindow SE. 2003.** Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7319–7327.
- Niza B, Coletta-Filho HD, Merfa MV, Takita MA, De Souza AA. 2015.** Differential colonization patterns of *Xylella fastidiosa* infecting citrus genotypes. *Plant Pathology*. doi: 10.1111/ppa.12381.
- Oliveira A C, Vallim MA, Semighini CP, Araújo WL, Goldman GH Machado MA. 2002.** Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 92: 1048–1054.
- Omar AA, Murata MM, El-Shamy HA, Graham JH, Grosser JW. 2018.** Enhanced resistance to citrus canker in transgenic mandarin expressing *Xa21* from rice. *Transgenic Research*. doi:10.1007/s11248-018-0065-2.
- Pel MJ, van Dijken AJ, Bardoel BW, Seidl MF, van der Ent S, van Strijp JA, Pieterse CM. 2014.** *Pseudomonas syringae* evades host immunity by degrading flagellin monomers with alkaline protease AprA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 603–610.
- Pfeilmeier, S, George J, Morel A, Roy S, Smoker M, Stransfeld L, Downie JA, Peeters N, Malone JG, Zipfel C. 2019.** EFR in *Medicago truncatula* reduces infection by a root pathogenic bacterium, but not nitrogen-fixing rhizobial symbiosis. *Plant Biotechnology Journal* 17: 569–579.
- Pignati AW, Lima FANS, Lara SS, Correa MLM, Barbosa JR, Leão LHC, Pignatti MG (2017)** Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for health surveillance. *Ciência & Saúde Coletiva* 22: 3281–3293.
- Prates HS, Nakano O, Gravena S. 1996.** A "minadora das folhas de citros" *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856. CATI, Campinas. 3p. (Comunicado Técnico, 129).
- Pruitt RN, Joe A, Zhang W, Feng W, Stewart V, Schwessinger B, Dinneny JR, Ronald PC. 2017.** A microbially derived tyrosine-sulfated peptide mimics a plant peptide hormone. *New Phytologist* 215: 725–736.

- Pruitt RN, Schwessinger B, Joe A, Thomas N, Liu F, Albert M, Robinson MR, Chan LJG, Luu DD, Chen H, Bahar O, Daudi A, De Vleeschauwer D, Caddell D, Zhang W, Zhao X, Li X, Heazlewood JL, Ruan D, Majumder D, Chern M, Kalbacher H, Midha S, Patil PB, Sonti RV, Petzold CJ, Liu CC, Brodbelt JS, Felix G, Ronald PC. 2015. The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a gram-negative bacterium. *Science Advances* **1**: e1500245.
- Ranf S, Gisch N, Schaffer M, Illig T, Westphal L, Knirel YA, Sánchez-Carballo PM, Zähringer U, Hückelhoven R, Lee J, Scheel D. 2015. A lectin S-domain receptor kinase mediates lipopolysaccharide sensing in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Immunology* **16**: 426–433.
- Rapicavoli J, Ingel B, Blanco-Ulate B, Cantu D, Roper C. 2017. *Xylella fastidiosa*: an examination of a re-emerging plant pathogen. *Molecular Plant Pathology* **19**: 786–800.
- Richard D, Tribot N, Boyer C, Terville M, Boyer K, Javegny S, M. Roux-Cuvelier M, Pruvost O, Moreau A, Chabirand A, Vernière C. 2017. First report of copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A causing Asiatic citrus canker in Réunion, France. *Plant Disease* **101**: 503.
- Rigano LA, Siciliano F, Enrique R, Sendín L, Filippone P, Torres PS, Qüesta J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov AA, Marano MR. 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **20**: 1222–1230.
- Roberto SR, Coutinho A, Lima JEOD, Miranda VS, Carlos EF. 1996. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia fascialis* em citros. *Fitopatologia Brasileira* **21**: 517–518.
- Roberto SR, Farias PRS, Bergamin Filho A. 2002. Geostatistical analysis of spatial dynamic of Citrus Variegated Chlorosis. *Fitopatologia Brasileira* **27**: 599–604.
- Rodrigues CM, De Souza AA, Takita MA, Kishi LT, Machado MA. 2013. RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. *BMC Genomics* **14**: 676.
- Rodriguez-Moreno L, Song Y, Thomma BP. 2017. Transfer and engineering of immune receptors to improve recognition capacities in crops. *Current Opinion in Plant Biology* **38**: 42–49.
- Roper MC, Greve LC, Labavitch JM, Kirkpatrick B. 2007. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 7252–7258.

- Rossetti V, De Negri JD. 1990.** Clorose variegada dos citros: revisão. *Laranja* **11**: 1–14.
- Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Tor M, Vries S, Zipfel C. 2011.** The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant Cell* **23**: 2440–2455.
- Ryan RP, Vorhölter FJ, Potnis N, Jones JB, Sluys MA, Bogdanove AJ, Dow JM. 2011.** Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Review* **9**: 344–355.
- Sakamoto T, Deguchi M, Brustolini OJB, Santos AA, Silva FF, Fontes EPB. 2012.** The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biology* **12**: 229.
- Saponari M, Boscia D, Nigro F, Martelli GP. 2013.** Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). Disease Note. *Journal of Plant Pathology* **94**: 688.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Fatmi MB, Chang CJ. 2004.** *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp *piercei*, subsp nov., *X. fastidiosa* subsp *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp *pauca* subsp nov. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 290–300.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Scheler A, Agarkova I, Stromber PE, Vidaver AK. 2006.** Emended classification of *Xanthomonas* pathogens on citrus. *Systematic and Applied Microbiology* **29**: 590–695.
- Schoonbeek H, Wang HH, Stefanato FL, Craze M, Bowden S, Wallington E, Zipfel C, Ridout CJ. 2015.** *Arabidopsis* EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. *New Phytologist* **206**: 606–613.
- Schuenzel EL, Scally M, Stouthamer R, Nunney L. 2005.** A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3832–3839.
- Schwessinger B, Ronald PC. 2012.** Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 451–82.
- Schwessinger B, Bahar O, Thomas N, Holton N, Nekrasov V, Ruan D, Canlas PE, Daudi A, Petzold CJ, Singan VR, Kuo R, Chovatia M, Daum C, Heazlewood JL, Zipfel C, Ronald PC. 2015.** Transgenic expression of the dicotyledonous pattern recognition receptor EFR in rice leads to ligand-dependent activation of defense responses. *PLOS Pathogens* **11**: e1004809

- Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA. 2015.** Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, **16**: 507–520.
- Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA. 2016.** A survey of *FLS2* genes from multiple citrus species identifies candidates for enhancing disease resistance to *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *Horticulture Research* **3**: 80.
- Silva ACR, Ferro JÁ, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR, Quaggio RB, et al. 2002.** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**: 459–463.
- Silva MS, De Souza AA, Takita MA, Labate CA, Machado MA. 2011.** Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*. *Proteome Science* **9**: 58.
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, et al. 1995.** A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**: 1804–1806.
- Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, et al. 2000.** The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* **406**: 151–157.
- De Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Campos MA, Teixeira JEC, Targon MLPN, Carlos EF, Ravasi JR, Fischer CN, Machado MA. 2007.** Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. *Genetic Molecular Biology* **30**: 965–971.
- De Souza AA, Takita MA, Amaral AM, Coletta-Filho HD, Machado MA. 2009.** Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent de citrus variegated chlorosis. *Tree and Forestry Science Biotechnology* **2**: 957–964.
- Taylor JE, Whitelaw CA. 2001.** Signals in abscission. *New Phytologist* **151**: 323–340.
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHJ. 2011.** Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell* **23**: 4–15.
- USDA.** Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em 05 de novembro de 2019.
- Van Sluys MA, de Oliveira MC, Monteiro-Vitorello CB, Miyaki CY, Furlan LR. 2003.** Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce’s disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *Journal Bacteriology* **185**: 1018–1026.
- Vinatzter BA, Monteil CL, Clarke CR. 2014.** Harnessing population genomics to understand how bacterial pathogens emerge, adapt to crop hosts, and disseminate. *Annual Review of Phytopathology* **52**: 19–43.

- Wan WL, Fröhlich K, Pruitt RN, Nürnberger T, Zhang L. 2019.** Plant cell surface immune receptor complex signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **50**: 18–28.
- Wang, GL, Song WY, Ruan DL, Sideris S, Ronald PC. 1996.** The cloned gene, Xa21, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* **9**: 850–855.
- Wang L, Albert M, Einig E, Furst U, Krust D, Felix G. 2016.** The pattern-recognition receptor CORE of *Solanaceae* detects bacterial cold-shock protein. *Nature Plants* **2**: 16185.
- Yamamoto PT, Roberto SR, Pria Júnior WD, Felipe MR, Miranda VS, Teixeira DC, Lopes JRS. 2002.** Transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas *Acrogonia virescens* e *Homalodisca ignorata* (Hemiptera: Cicadellidae) em plantas cítricas. *Summa Phytopathologica* **28**: 178–181.
- Zan Y, Ji Y, Zhang Y, Yang S, Song Y, Wang J. 2013.** Genome-wide identification, characterization and expression analysis of populus leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes. *BMC Genomics* **14**: 318.
- Zimaro T, Thomas L, Marondedze C, Garavaglia BS, Gehring C, Ottado J, Gottig N. 2013.** Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. *BMC Microbiology* **13**: 186.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, Felix G. 2006.** Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749–760.
- Zipfel C, Oldroyd GED. 2017.** Plant signaling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**: 328–336. doi: 10.1038/nature22009

9. Anexos

Anexo 1: Alinhamento da sequência CDS do gene *CrLRR-RK* provenientes da versão 0.9 (clementine0.9_001431m) e 1.0 (Ciclev10014130m) do genoma disponível de *C. clementina*.

```

clementine0.9_001431m      -----ATGCATCTTGCCACTTTGGCTGTTCT
Ciclev10014130m            ATGCATTCCTCACCTTTCCCTTTAATGCATCTTGCCACTTTGGCTGTTCT
                             *****

clementine0.9_001431m      CCTACACATAATAAAATGGCTATCACTTGGTGTAGATTCACTTCTCTGA
Ciclev10014130m            CCTACACATAATAAAATGGCTATCACTTGGTGTAGATTCACTTCTCTGA
                             *****

clementine0.9_001431m      GCATTGTTACGGACAGAGAGGCCTTGATCTCATTCAAGTCTCAAATAAGC
Ciclev10014130m            GCATTGTTACGGACAGAGAGGCCTTGATCTCATTCAAGTCTCAAATAAGC
                             *****

clementine0.9_001431m      CTGGAGAGTAGTTCTAGTAGCCCTCTGTCTTCTTGAATATTAGTCAAAG
Ciclev10014130m            CTGGAGAGTAGTTCTAGTAGCCCTCTGTCTTCTTGAATATTAGTCAAAG
                             *****

clementine0.9_001431m      CTCTTCTCCTTGCTCATGGCCGGGAGTTACCTGCAACAATTTTCGGCCAAA
Ciclev10014130m            CTCTTCTCCTTGCTCATGGCCGGGAGTTACCTGCAACAATTTTCGGCCAAA
                             *****

clementine0.9_001431m      GAGTGATTGGCCTCAATCTCTCCGGCTTCGGAATTGAGGGGACTATAAGC
Ciclev10014130m            GAGTGATTGGCCTCAATCTCTCCGGCTTCGGAATTGAGGGGACTATAAGC
                             *****

clementine0.9_001431m      CCTCATATTGGCAACCTCTCACTCCTACGTTCACTTCAACTCCAAAACAA
Ciclev10014130m            CCTCATATTGGCAACCTCTCACTCCTACGTTCACTTCAACTCCAAAACAA
                             *****

clementine0.9_001431m      CAAGCTTTTCAGGGACTCTTCCAAGCGAAATTGGTAATCTTTTTCGCTTGA
Ciclev10014130m            CAAGCTTTTCAGGGACTCTTCCAAGCGAAATTGGTAATCTTTTTCGCTTGA
                             *****

clementine0.9_001431m      GAGTTTTGAACATCAGCTCCAACAGCTTACGAGGTGTAATACCTCTAAAC
Ciclev10014130m            GAGTTTTGAACATCAGCTCCAACAGCTTACGAGGTGTAATACCTCTAAAC
                             *****

clementine0.9_001431m      ATAAGCAAGTTAACTGAGCTCAAGATCCTTGACTTGACGGCAAATAAGAT
Ciclev10014130m            ATAAGCAAGTTAACTGAGCTCAAGATCCTTGACTTGACGGCAAATAAGAT
                             *****

clementine0.9_001431m      TACAGGCAGAGTTCCTGATGAACCACTCCGTAATCTTAGAAGTCTGCAAG
Ciclev10014130m            TACAGGCAGAGTTCCTGATGAACCACTCCGTAATCTTAGAAGTCTGCAAG
                             *****

clementine0.9_001431m      TCCTGAACTTGGGGAAAAATCTTCTCTGGGGCTCAATTCCACCATCCATT
Ciclev10014130m            TCCTGAACTTGGGGAAAAATCTTCTCTGGGGCTCAATTCCACCATCCATT
                             *****

clementine0.9_001431m      GCAAATCTGTCTACTCAACACCTTAACTTAGGCACAAATAACCTCAC
Ciclev10014130m            GCAAATCTGTCTACTCAACACCTTAACTTAGGCACAAATAACCTCAC
                             *****

clementine0.9_001431m      TGGCAGCATAACCAAGTGATCTGAGCCGTCTTCAAACCTTGAATTCCTTG
Ciclev10014130m            TGGCAGCATAACCAAGTGATCTGAGCCGTCTTCAAACCTTGAATTCCTTG
                             *****

clementine0.9_001431m      ATCTCACCATCAACAATCTCATTTGGCACTGTTCTTCTACCATTTACAAC
Ciclev10014130m            ATCTCACCATCAACAATCTCATTTGGCACTGTTCTTCTACCATTTACAAC
                             *****

```

clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	ATGACTTCTCTTGTATTATTTGGGTTTAGCTTCAAATCAACTCTGGGGAGA ATGACTTCTCTTGTATTATTTGGGTTTAGCTTCAAATCAACTCTGGGGAGA *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GATTCCCTATGATGTTGGGGATAAGCTCCCAAATCTTCTGGGCTTCAATT GATTCCCTATGATGTTGGGGATAAGCTCCCAAATCTTCTGGGCTTCAATT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	TCTGCTTCAACAAATTTACAGGAAAAATTCAGGGTCTTGCACAACCTC TCTGCTTCAACAAATTTACAGGAAAAATTCAGGGTCTTGCACAACCTC *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	ACCAATATACAAATTATCCGGATGGCGCACAACTTCTGGAGGGAACTGT ACCAATATACAAATTATCCGGATGGCGCACAACTTCTGGAGGGAACTGT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GCCGCCAGGTTTGGGGAATCTCCCTTTCCTAAAGATGTATAATATTGGTT GCCGCCAGGTTTGGGGAATCTCCCTTTCCTAAAGATGTATAATATTGGTT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	TCAATAAGATTGTTGGCTCAGGAGATGAGGGTCTTTCATTCATCACTTCT TCAATAAGATTGTTGGCTCAGGAGATGAGGGTCTTTCATTCATCACTTCT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	TTAACGAACAGCACCCGTCTCAACTTCCTTGCCTTCGATGGCAACCAGTT TTAACGAACAGCACCCGTCTCAACTTCCTTGCCTTCGATGGCAACCAGTT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	TGAAGGCGAAATTCCAGAATCCATCGGCAATCTTCCAACGTGCTCTCAA TGAAGGCGAAATTCCAGAATCCATCGGCAATCTTCCAACGTGCTCTCAA *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	AACTGTACATGGGAGGCAATCGTTTTTATGGGAAAATACCTACCTCGATT AACTGTACATGGGAGGCAATCGTTTTTATGGGAAAATACCTACCTCGATT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GGCCGTCTCAGGAGCTTGACTCTGCTGAATTTGAGCTACAATTCGATTTC GGCCGTCTCAGGAGCTTGACTCTGCTGAATTTGAGCTACAATTCGATTTC *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	TGGCGAAATCCTAACGGAAATAGGCCAATTACAAGAACTGCAGTCACTGG TGGCGAAATCCTAACGGAAATAGGCCAATTACAAGAACTGCAGTCACTGG *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	ATTTGGCTGGAAATCAAATCTCTGGTAGCATTCCGAATACCCTTGGTAAT ATTTGGCTGGAAATCAAATCTCTGGTAGCATTCCGAATACCCTTGGTAAT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	CTCAAGAAGTTGAACCAGATCGATTATCAGGAAATGAATTGGCCAGTGA CTCAAGAAGTTGAACCAGATCGATTATCAGGAAATGAATTGGCCAGTGA *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	AATACCAACTTCATTGGAACTTTCAGAATCTACTTTCTATTGATCTGT AATACCAACTTCATTGGAACTTTCAGAATCTACTTTCTATTGATCTGT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	CCAACAACAAGCTCAACGGAACATCCCTAAAGAGATTCTAAGCCTATCT CCAACAACAAGCTCAACGGAACATCCCTAAAGAGATTCTAAGCCTATCT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	AGTTTGACCACCATTTGTGAATCTGTCTAAGAATTCCTTGACGGAACCTT AGTTTGACCACCATTTGTGAATCTGTCTAAGAATTCCTTGACGGAACCTT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GCCCGAAGAAATTGGCATGCTAGGAAAT----- GCCCGAAGAAATTGGCATGCTAGGAAATGTCGTTACCATCGACCTATCAG *****

```

clementine0.9_001431m  -----AGC
Ciclev10014130m        CCAATGGCCTGTCCGGTAATCTGCCAAACTCCTTCAAAAAGTGAAGAGC
                               ***

clementine0.9_001431m  TTGGAGAACTATTGATGGCTAACAATAAATTCTCGGGGCTATTCCAAA
Ciclev10014130m        TTGGAGAACTATTGATGGCTAACAATAAATTCTCGGGGCTATTCCAAA
                               *****

clementine0.9_001431m  TATTTTGGCGGAGTTGAAGGGCTTGAAGTTCTAGACCTCTCTCCAACA
Ciclev10014130m        TATTTTGGCGGAGTTGAAGGGCTTGAAGTTCTAGACCTCTCTCCAACA
                               *****

clementine0.9_001431m  AACTTTCTGGCTCCATTCTCTGATCTCCAAAATTTACGAGCCCTTCGT
Ciclev10014130m        AACTTTCTGGCTCCATTCTCTGATCTCCAAAATTTACGAGCCCTTCGT
                               *****

clementine0.9_001431m  TCTTTGAATCTCACATTCAATAATCTAGAAGGAGTAGTTCCCCGTGAAG
Ciclev10014130m        TCTTTGAATCTCACATTCAATAATCTAGAAGGAGTAGTTCCCCGTGAAG
                               *****

clementine0.9_001431m  AATTTTCAGACATACGTCCATGGTCCATTTGGAAGCAATCCAAAGCTTT
Ciclev10014130m        AATTTTCAGACATACGTCCATGGTCCATTTGGAAGCAATCCAAAGCTTT
                               *****

clementine0.9_001431m  GCTTGCATTTGGGATGTGAGAACTCTTCTAGTCATGGAAGAAGGCGAATC
Ciclev10014130m        GCTTGCATTTGGGATGTGAGAACTCTTCTAGTCATGGAAGAAGGCGAATC
                               *****

clementine0.9_001431m  ATTATATATGTTATAGTTGCCATTATTGCTATCATAGCAGGTTGTTTCCT
Ciclev10014130m        ATTATATATGTTATAGTTGCCATTATTGCTATCATAGCAGGTTGTTTCCT
                               *****

clementine0.9_001431m  AATTTTTTGGCTGATTATTGTGAGGAAAGGCAAAGCGAAGCCCATTGGAG
Ciclev10014130m        AATTTTTTGGCTGATTATTGTGAGGAAAGGCAAAGCGAAGCCCATTGGAG
                               *****

clementine0.9_001431m  TTTCTACATTATTCAAACATAGCCCTCAAATGATTTCATATGATGAGCTG
Ciclev10014130m        TTTCTACATTATTCAAACATAGCCCTCAAATGATTTCATATGATGAGCTG
                               *****

clementine0.9_001431m  CGTCGAGCCACAGGGAATTTTAGCCATGAAAATTTGATTGGAAGTGGGAG
Ciclev10014130m        CGTCGAGCCACAGGGAATTTTAGCCATGAAAATTTGATTGGAAGTGGGAG
                               *****

clementine0.9_001431m  CTTTGGGTCAAGTGTACAAAGGATATCTCAGAGAAGGCATTAGTGTGCGAG
Ciclev10014130m        CTTTGGGTCAAGTGTACAAAGGATATCTCAGAGAAGGCATTAGTGTGCGAG
                               *****

clementine0.9_001431m  TTAAGGTTCTTGACATCGAAAGTACTGGAACCTGGAAGAGTTTTTTTGCC
Ciclev10014130m        TTAAGGTTCTTGACATCGAAAGTACTGGAACCTGGAAGAGTTTTTTTGCC
                               *****

clementine0.9_001431m  GAATGTGAAGCTTTGAGAAACACCAGGCATCGTAATCTTGTCAAACTGAT
Ciclev10014130m        GAATGTGAAGCTTTGAGAAACACCAGGCATCGTAATCTTGTCAAACTGAT
                               *****

clementine0.9_001431m  AACATCATGCTCTAGCTTGGAACCTCAAGAATATGGAGTTTCTTGCTCTGG
Ciclev10014130m        AACATCATGCTCTAGCTTGGAACCTCAAGAATATGGAGTTTCTTGCTCTGG
                               *****

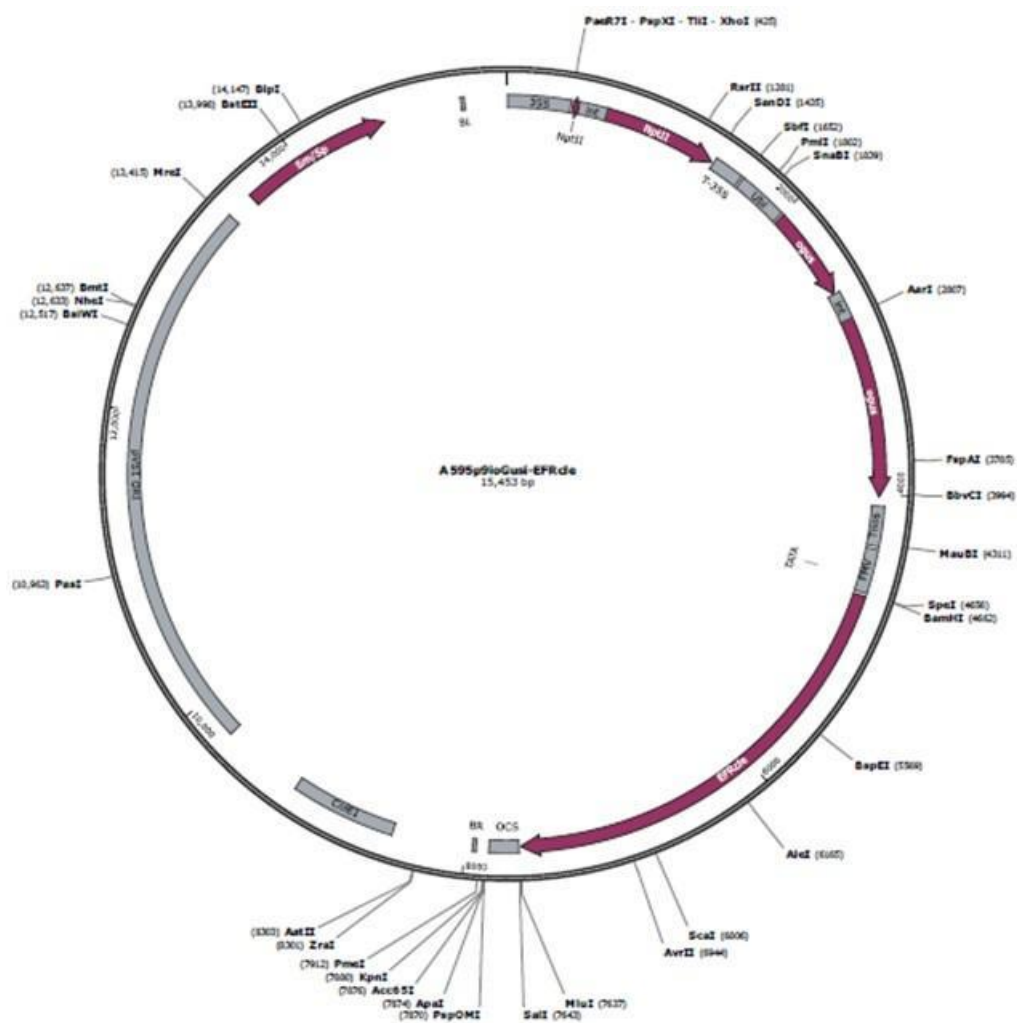
clementine0.9_001431m  TATATGAATTCTAGGTAATGGAAGCTTGGGAGATTGGATTCATGGCGAG
Ciclev10014130m        TATATGAATTCTAGGTAATGGAAGCTTGGGAGATTGGATTCATGGCGAG
                               *****

clementine0.9_001431m  AGAAAGAATGAACATGGTAATGGACTTAATTTTCTGGAGAGATTAAATAT
Ciclev10014130m        AGAAAGAATGAACATGGTAATGGACTTAATTTTCTGGAGAGATTAAATAT
                               *****

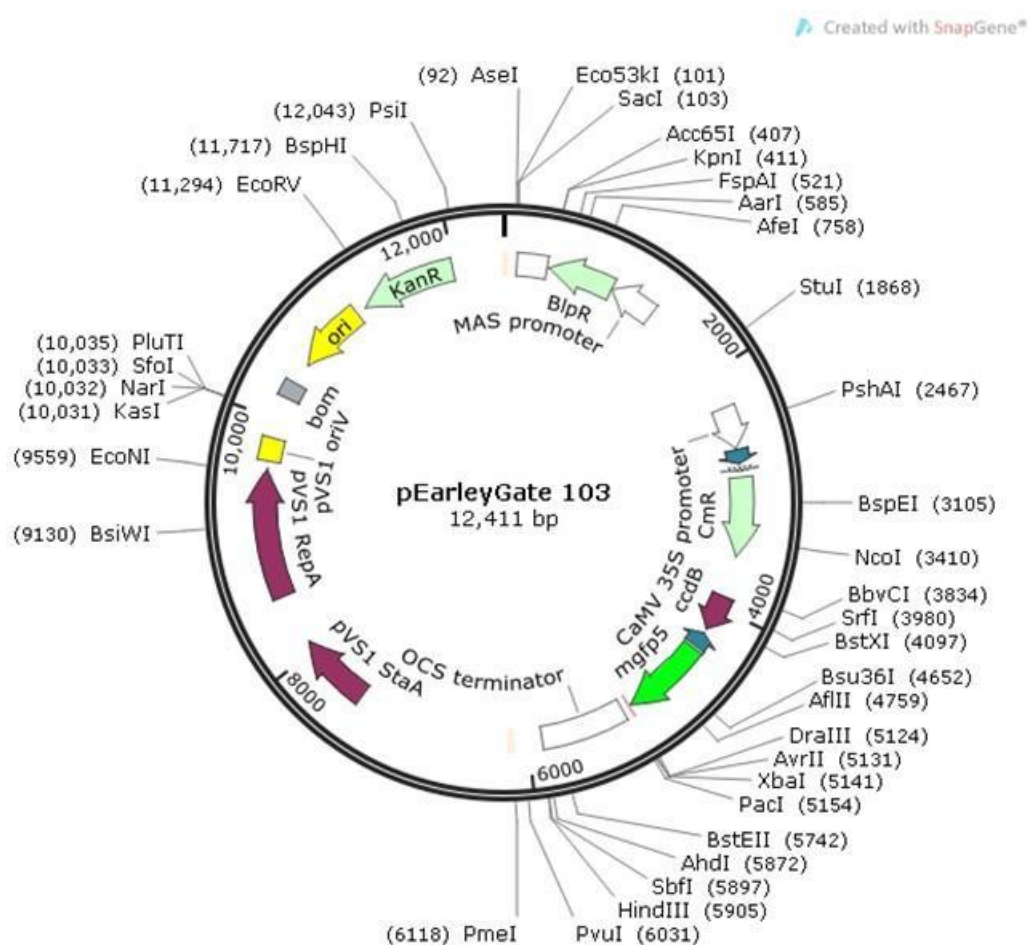
```

clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	AGCCATTGATATCGCCTCTGCACTGGACTACCTTCACAATGACTGTGAAG AGCCATTGATATCGCCTCTGCACTGGACTACCTTCACAATGACTGTGAAG *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	TTCCAATAGTACACTGTGATTTGAAGCCAGGCAACATTCTTTTGGACGAA TTCCAATAGTACACTGTGATTTGAAGCCAGGCAACATTCTTTTGGACGAA *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GATATGACAGCAAAGGTGGGAGATTTGGGCTGGCCAGGTCTCTACTAGA GATATGACAGCAAAGGTGGGAGATTTGGGCTGGCCAGGTCTCTACTAGA *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GAGAATAGGCAATCAATCTTCTATTAGCTCCACACACGTTTTAAAGGGTT GAGAATAGGCAATCAATCTTCTATTAGCTCCACACACGTTTTAAAGGGTT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	CAATTGGTTACATACCTCCAGAATATGGTTTAGGTGAAAAGCCATCAACA CAATTGGTTACATACCTCCAGAATATGGTTTAGGTGAAAAGCCATCAACA *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GCTGGAGATGTATACAGCTTCGGAGTGATGTTACTCGAAATTTTACCGG GCTGGAGATGTATACAGCTTCGGAGTGATGTTACTCGAAATTTTACCGG *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	AATGAGTCCAACCCATGAGAGTTTGTCTGGAGAAGTTAGTCTTGTTAAAT AATGAGTCCAACCCATGAGAGTTTGTCTGGAGAAGTTAGTCTTGTTAAAT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GGGTGGAATCAAATTTCCCAAAGAATGCGCTGCAAGTGTTAGATCGGGAG GGGTGGAATCAAATTTCCCAAAGAATGCGCTGCAAGTGTTAGATCGGGAG *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	CTGCGACAGCTGATGATGAGCAGTGAAAGCCAAACCATAACAATTACATGA CTGCGACAGCTGATGATGAGCAGTGAAAGCCAAACCATAACAATTACATGA *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	TTGTTTGATCACAATCATTGAATCTGTTGGGCTGTCCTGCACCACTGAAT TTGTTTGATCACAATCATTGAATCTGTTGGGCTGTCCTGCACCACTGAAT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	CTCCCGGTGGTCGCATTGACATCAGAGAAGCTCTCCGCAGGCTCAAAAAT CTCCCGGTGGTCGCATTGACATCAGAGAAGCTCTCCGCAGGCTCAAAAAT *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	GCTCAAAAGATCCTTCTTAAGCGGCGGCAGCCTAATGAAAAAACCATGAA GCTCAAAAGATCCTTCTTAAGCGGCGGCAGCCTAATGAAAAAACCATGAA *****
clementine0.9_001431m Ciclev10014130m	TTAA TTAA ***

Anexo 2: Vetor de transformação contendo o gene *CrLRR-RK* sob controle do promotor constitutivo FMV para transformação em citros.



Anexo 3: Vetor pEarleyGate103 utilizado para transformar *Arabidopsis*. Os genes estão sob controle do promotor constitutivo 35S e fusionado com a proteína GFP.



Anexo 4: Condições da PCR, tamanho do amplicon e sequência dos primers utilizados para amplificar os genes (totais e parciais) e fusionar as quimeras.

Fragmentos	Amplicon (pb)	Condições da PCR	Sequência de primers
FLS2	3519	98°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 3 min e 30 s (35 ciclos)	F: 5'- CACCATGAAGTTACTCTCAAAGACCTTTTTGATATTA ACTCTCACCTTCTTCTTTGG-3' R: 5'-AACTTCTCGATCCTCGTTACGATCTTCTCGAAATGAATTCG-3'
CrLRR-RK	3051	98°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 3 min (35 ciclos)	F: 5'- CACCATGCATTCTCACCTTTCCCTTTAATGCATCTTGC -3' R: 5'-ATTCATGGTTTTTTCATTAGGCTGCCGCCG-3'
FLS2-LRR	2487	98°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 2 min e 30 s (35 ciclos)	F: 5'- CACCATGAAGTTACTCTCAAAGACCTTTTTG -3' R: 5'-GGCTTCGCTTTGCCTTTCCTCACGGTTAGAATCAGAACAAGAAGCAGG-3'
Cr-LRR	2019	98°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 2 min (35 ciclos)	F: 5'- CACCATGCATTCTCACCTTTCCCTTTAATGC -3' R: 5'-CTTTTTTCTTTTTTCTTGCAACAAATAATCAGCCAAAAAATTAGG-3'
FLS2-KIN	1032	98°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min (35 ciclos)	F: 5'-CCTAATTTTTTGGCTGATTATTGTTGCAAGAAAAAAGAAAAAAG-3' R: 5'-AACTTCTCGATCCTCGTTACG-3'
Cr-KIN	1032	98°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 1 min (35 ciclos)	F: 5'-CCTGCTTCTTGTCTGATTCTAACCGTGAGGAAAGGCAAAGCGAAG-3' R: 5'-ATTCATGGTTTTTTCATTAGGCTG-3'
FLS2:CrLRR-RK	3519	1° passo (sem primers) - 98°C, 5 min; 68°C, 15 min (5 ciclos); 2° passo (com primers) - 98°C, 15 s, 60°C, 30 s, 72°C, 3 min e 30 s (35 ciclos)	F: 5'- CACCATGAAGTTACTCTCAAAGACCTTTTTGATATTA ACTCTCACCTTCTTCTTTGG-3' R: 5'-ATTCATGGTTTTTTCATTAGGCTGCCGCCG-3'
CrLRR-RK:FLS2	3051	1° passo (sem primers) - 98°C, 5 min; 68°C, 15 min (5 ciclos); 2° passo (com primers) - 98°C, 15 s, 60°C, 30 s, 72°C, 3 min (35 ciclos)	F: 5'- CACCATGCATTCTCACCTTTCCCTTTAATGCATCTTGC -3' R: 5'-AACTTCTCGATCCTCGTTACGATCTTCTCGAAATGAATTCG-3'

Anexo 5: Sequência dos primers utilizados para sequenciar os vetores contendo os genes *CrLRR-RK* e *FLS2* e os genes quimeras entre eles

Nome	Sequência (5'-3')	Posição (pb)	Tamanho (pb)	CG (%)
F-FLS2.1	GTTGTCCGGTGATGTTCCCTG	465	20	55%
F-FLS2.2	GGTTGGACCGATATCAGAAG	972	20	50%
F-FLS2.3	CACAGGGAGAATCCCGAGAG	1545	20	60%
F-FLS2.4	CCAGATGAAGTCTTCCAAGG	2068	20	50%
R-FLS2.5	GCTGGCTTCAGATCACAATG	2983	20	50%
F-Cle.1	GCAGAGTTCCTGATGAACCAC	506	21	52%
F-Cle.2	GTTGGCTCAGGAGATGAGG	1012	19	58%
F-Cle.3	GGCATGCTAGGAAATGTCTG	1564	19	53%
R-Cle.4	CCTTTGCTGTTCATATCTTCGTC	2545	22	45.5%

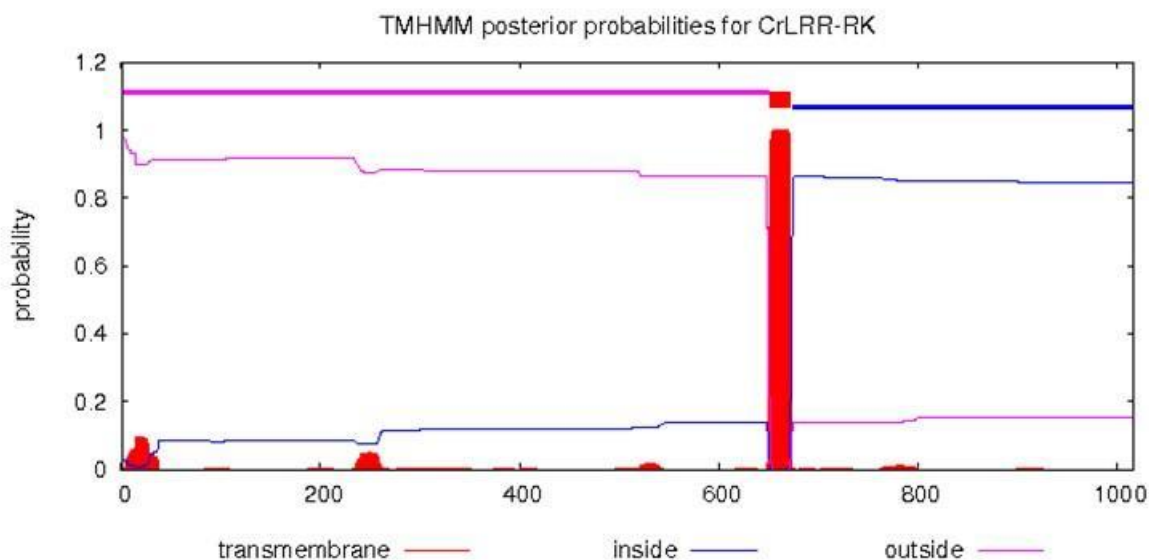
Anexo 6: Predição dos domínios do receptor *CsLRR-RK* de *C. sinensis*. A) Esquema do receptor com seu peptídeo sinal (SP), repetições ricas em leucina (LRR), domínio transmembrana (TM) e domínio quinase, com destaque em vermelho para o sítio ativo da quinase. B) Sequência da proteína com destaques para a localização do peptídeo sinal e domínio transmembrana (preto), LRRs (cinza claro) e domínio quinase (cinza escuro). Está identificado em um box preto no domínio quinase os resíduos de cisteína e aspartato (CD). Os aminoácidos diferentes em relação ao receptor *CrLRR-RK* de *C. reticulata* foram marcados de vermelho.



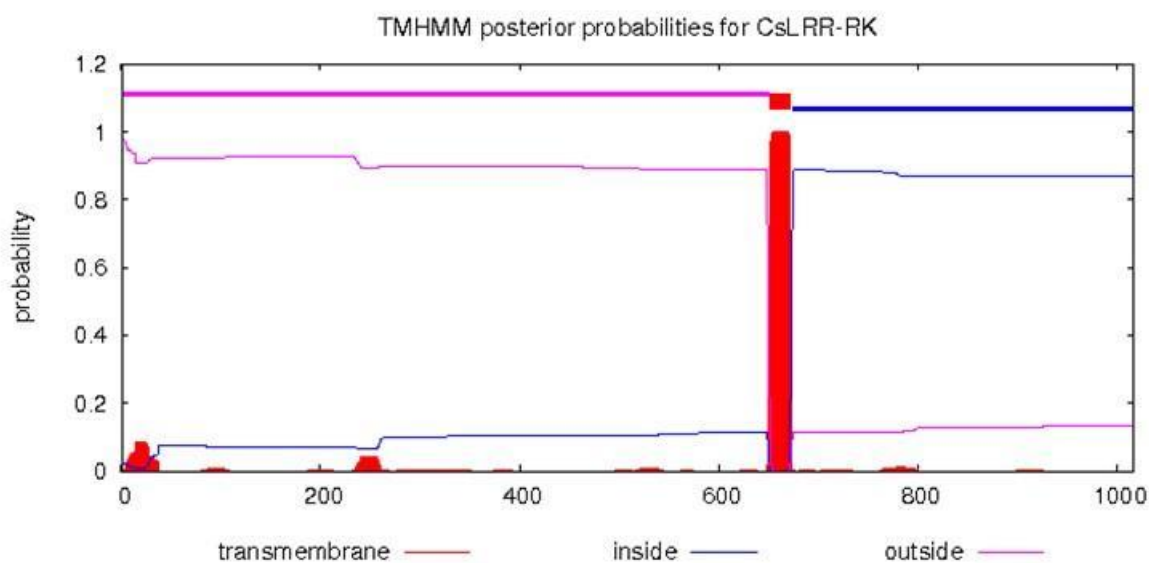
MHSSPFPLMHLATLAVLLHIKWLSLGVDSASLSIVTDREALISFKSQISLESSSSPLSSWNISQSSSP
 CSWPGVTCNNFGQRVIGLNLSGFGIEGTISP HIGNLSLLRSLQLQNNKLSGTL PSEIGNLFRLRVLNISS
 NSLRGVIPLNISKLTTELKILDLTANKITGRVPDEPLRNLRSLQVLNLGKNLLWGSIPPSIANLSSINTLN
 LGTNNLTGSIPSDLSRLQNLKFLDLTINNLTIGTVPSTIYNMTSLVYLGLASNQLWGEIPYDVGDKLPNLL
 GFNFCFNKFTGKIPGSLHNLNIQIIRMAHNLLEGTVPPLGNLPLFLKMYNIGFNKIVGSGDEGLSFITS
 LTNSTRNLNLAFDGNQFEGEIPESIGNLSNVLSKLYMGGNRFYGKIPTSIGRLRSLTLLNLSYNSISGEI
 LTEIGQLQELQSLDLAGNQISGSIPNTLGNLKKLNQIDLSGNEIASEIPTSFNGFQNLSSIDLNNKLN
 NIPKEILSLSSLTIVNLSKNFLDGTLP EEIGMLGNVVTIDLSANGLSGNLPNSFKNCKSLEKLLMANNK
 FSGPIPNILAEIKGLEVLDLSSNKLSGSIPSDLQNLRLRSLNLT FNNLEGVVPREGIFRHTSMVHLEGN
 PKLCLHLGCENSSSHGRRRTIIYVIVAIIAIIAGCFLIFWLIIVRK GKAKPIGVSTLFKHSPQMISYDEL
 RRATGNF SHENLIGSGSFGSVYKGYLREGISVAVKVLDIESTGTWKSFFAECEALRNTRHRNLVKLITSC
 SSDFKNMEFLALVYEFNGSLGDWIHGERKNEHGNGLNFLERLNIADIASALDYLHNDCEVPIVHCD
 LKPGNILLDEDMTAKVGDFGLARSLERIGNQSSISSTHVLKGSIGYIPPEYGLGEKPSTAGDVYSFGVM
 LLEIFTGMSPTHE SFAGEVSLVKWVESNFPKNAIQVLDRELRLQMMSSSQTIQLHDCLITIIESVGLSC
 TTESPGGRIDIREALRRLKNAQKILKRRQPNEKTMN

Anexo 7: Resultado da predição de domínio transmembrana gerado pelo TMHMM Server v2.2 para as proteínas CrLRR-RK e CsLRR-RK.

```
# CrLRR-RK Length: 1017
# CrLRR-RK Number of predicted TMHs: 1
# CrLRR-RK Exp number of AAs in TMHs: 26.99428
# CrLRR-RK Exp number, first 60 AAs: 2.06664
# CrLRR-RK Total prob of N-in: 0.02524
CrLRR-RK      TMHMM2.0      outside 1 650
CrLRR-RK      TMHMM2.0      TMhelix 651 673
CrLRR-RK      TMHMM2.0      inside 674 1017
```



```
# CsLRR-RK Length: 1017
# CsLRR-RK Number of predicted TMHs: 1
# CsLRR-RK Exp number of AAs in TMHs: 26.55892
# CsLRR-RK Exp number, first 60 AAs: 1.87998
# CsLRR-RK Total prob of N-in: 0.02441
CsLRR-RK      TMHMM2.0      outside 1 650
CsLRR-RK      TMHMM2.0      TMhelix 651 673
CsLRR-RK      TMHMM2.0      inside 674 1017
```



Anexo 8: Determinação da presença de peptídio sinal nas proteínas, com destaque para o sítio de clivagem que acontece na posição 30 e 31.

LRR-RK

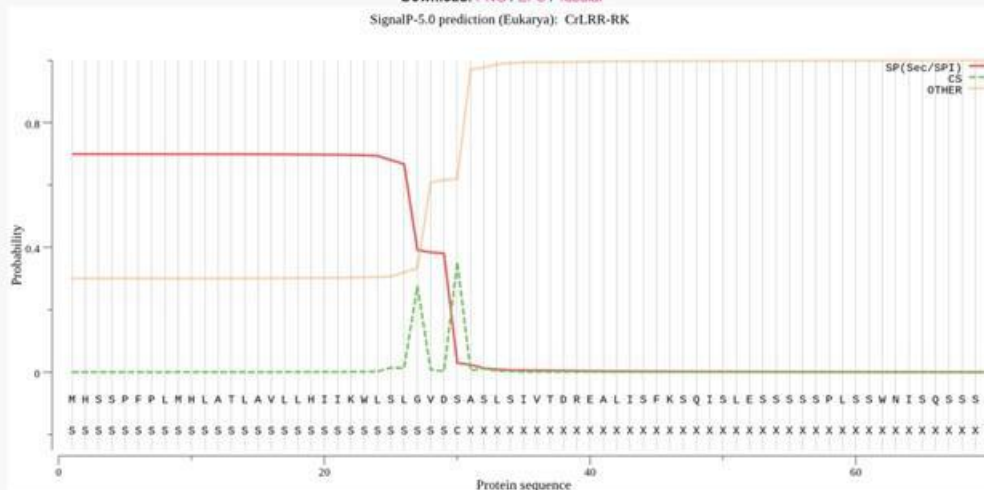
Prediction: Signal peptide (Sec/SPI)

leavage site between pos. 30 and 31: VDS-AS. Probability: 3524

Protein type	Signal Peptide (Sec/SPI)	Other
Likelihood	0.6993	0.3007

Download: [PNG](#) / [EPS](#) / [Tabular](#)

SignalP-5.0 prediction (Eukarya): CrLRR-RK



CsLRR-RK

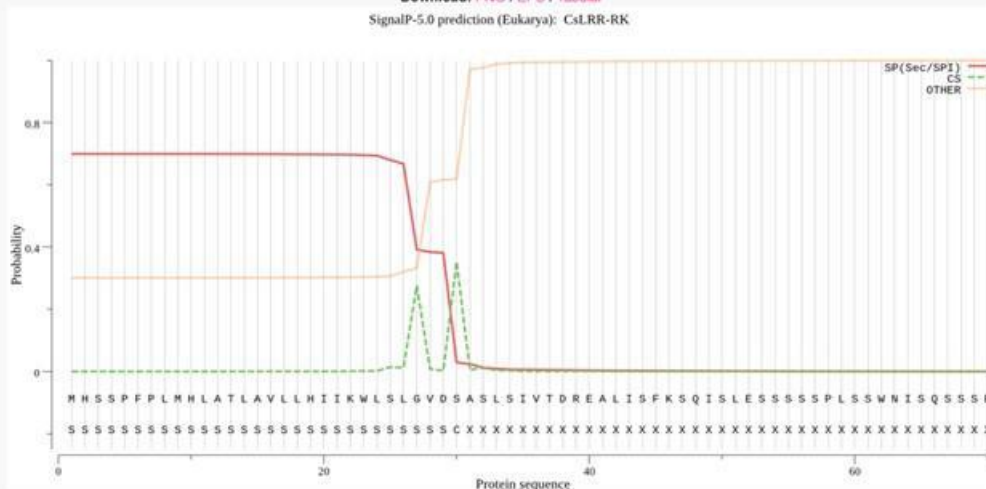
Prediction: Signal peptide (Sec/SPI)

Cleavage site between pos. 30 and 31: VDS-AS. Probability: 0.3524

Protein type	Signal Peptide (Sec/SPI)	Other
Likelihood	0.6993	0.3007

Download: [PNG](#) / [EPS](#) / [Tabular](#)

SignalP-5.0 prediction (Eukarya): CsLRR-RK



Anexo 9: Alinhamento das sequências de proteínas codificadas pelos genes *CrLRR-RK* e *CsLRR-RK*, onde são destacadas as substituições não-sinônimas.

CrLRR-RK	MHSSPFPLMHLATLAVLLHIKWLSLGVDSASLSIVTDREALISFKSQISLESSSSSSPLS	60
CsLRR-RK	MHSSPFPLMHLATLAVLLHIKWLSLGVDSASLSIVTDREALISFKSQISLESSSSSSPLS *****	60
CrLRR-RK	SWNISQSSSPCSWPGVTCNNFGQRVIGLNLSGFGIEGTISPHIGNLSLLRSLQLQNNKLS	120
CsLRR-RK	SWNISQSSSPCSWPGVTCNNFAQRVIGLNLSGFGIEGTISPHIGNLSLLRSLQLQNNKLS *****	120
CrLRR-RK	GTLPEIGNLFRRLRVLNISNSLRGVIPLNISKLTTELKILDLTANKITGRVPDEPLRNLR	180
CsLRR-RK	GTLPEIGNLFRRLRVLNISNSLRGVIPLNISKLTTELKILDLTANKITGRVPDEPLRNLR *****	180
CrLRR-RK	SLQVLNLGKNLLWGSIPPSIANLSSSLNTLNLTGNNLTGSIPSDLSRLQNLKFLDLTINNL	240
CsLRR-RK	SLQVLNLGKNLLWGSIPPSIANLSSSLNTLNLTGNNLTGSIPSDLSRLQNLKFLDLTINNL *****	240
CrLRR-RK	IGTVPSTIYNMTSLVYLGLASNQLWGEIPYDVGDKLPNLLGFNFNCFNKFTGKIPGSLHNL	300
CsLRR-RK	IGTVPSTIYNMTSLVYLGLASNQLWGEIPYDVGDKLPNLLGFNFNCFNKFTGKIPGSLHNL *****	300
CrLRR-RK	TNIQIIRMAHNLLEGTVPPGLGNLPFLKMYNIGFNKIVGSGDEGLSFITSLTNSTRNLNLF	360
CsLRR-RK	TNIQIIRMAHNLLEGTVPPGLGNLPFLKMYNIGFNKIVGSGDEGLSFITSLTNSTRNLNLF *****	360
CrLRR-RK	AFDGNQFEGEIPESIGNLSNVLSKLYMGGNRFYGKIPTSIGRLRSLTLLNLSYNSISGEI	420
CsLRR-RK	AFDGNQFEGEIPESIGNLSNVLSKLYMGGNRFYGKIPTSIGRLRSLTLLNLSYNSISGEI *****	420
CrLRR-RK	LTEIGQLQELQSLDLAGNQISGSIPNTLGNLKKLNQIDLSGNELEASEIPTSFNGFNQNLIS	480
CsLRR-RK	PTEIGQLQELQSLDLAGNQISGSIPNTLGNLKKLNQIDLSGNELEASEIPTSFNGFNQNLIS *****	480
CrLRR-RK	IDLSNNKLNNGNIPKEILSLSSLTTIVNLSKNFLDGTLPTEEIGMLGNVVTIDLSANGLSGN	540
CsLRR-RK	IDLSNNKLNNGNIPKEILSLSSLTTIVNLSKNFLDGTLPTEEIGMLGNVVTIDLSANGLSGN *****	540
CrLRR-RK	LPNSFKNCKSLEKLLMANNKFSGPIPNILAEKNGLEVLDLSSNKLSGSIPSDLQNLRALR	600
CsLRR-RK	LPNSFKNCKSLEKLLMANNKFSGPIPNILAEKNGLEVLDLSSNKLSGSIPSDLQNLRALR *****	600
CrLRR-RK	SLNLTFFNNLEGVVPREGIFRHTSMVHLEGPNKLCCLHLGCENSSSHGRRRIIIVIVAVIAA	660
CsLRR-RK	SLNLTFFNNLEGVVPREGIFRNTSMVHLEGPNKLCCLHLGCENSSSHGRRRIIIVIVAVIAA *****	660
CrLRR-RK	IIAGCFLIFWLIIVRKGAAPIGVSTLFKHSPQMISYDELRRATGNFSHENLIGSGSFGS	720
CsLRR-RK	IIAGCFLIFWLIIVRKGAAPIGVSTLFKHSPQMISYDELRRATGNFSHENLIGSGSFGS *****	720
CrLRR-RK	VYKGYLREGISVAVKVLDIESTGTWKSFFAECEALRNTRHRNLVKLITSCSSLDFFKNMEF	780
CsLRR-RK	VYKGYLREGISVAVKVLDIESTGTWKSFFAECEALRNTRHRNLVKLITSCSSLDFFKNMEF *****	780
CrLRR-RK	LALVYEFNGSLGDWIGHGERKNEHGNGLNFLERLNIADIASALDYLHNDCEVPIVHCD	840
CsLRR-RK	LALVYEFNGSLGDWIGHGERKNEHGNGLNFLERLNIADIASALDYLHNDCEVPIVHCD *****	840
CrLRR-RK	LKPGNILLDEDMTAKVGDFGLARSLERIGNQSSISSTHVLKGSIGYIPPEYGLGKPKST	900
CsLRR-RK	LKPGNILLDEDMTAKVGDFGLARSLERIGNQSSISSTHVLKGSIGYIPPEYGLGKPKST *****	900
CrLRR-RK	AGDVYSFGVMLLEIFTGMSPTHESFAGEVSLVKWVESNFPKNAIQVLDRELRLQMMSSSES	960
CsLRR-RK	AGDVYSFGVMLLEIFTGMSPTHESFAGEVSLVKWVESNFPKNAQQVLDRELRLQMMSSSES *****	960

CrLRR-RK

QTIQLHDCLITIIIESVGLSCTTESPGGRIDIREALRRLKNAQKILLKRRQPNEKTMN

1017

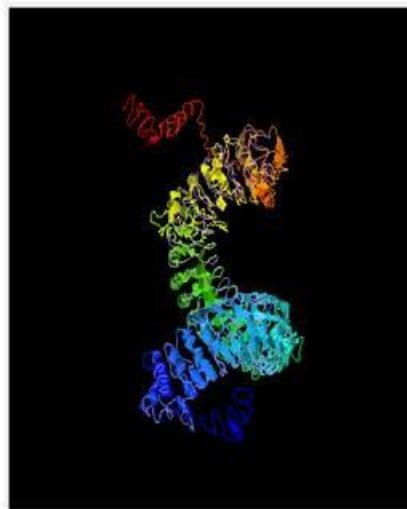
CsLRR-RK

QTIQLHDCLITIIIESVGLSCTTESPGGRIDIREALRRLKNAQKILLKRRQPNEKAMN

1017

*****:***

Anexo 10: Resultado do I-Tasser para a proteínas CrLRR-RK, onde são mostradas as 10 proteínas do PBD mais próximas a proteína em questão, assim como cinco prováveis sítios de ligação na proteína.

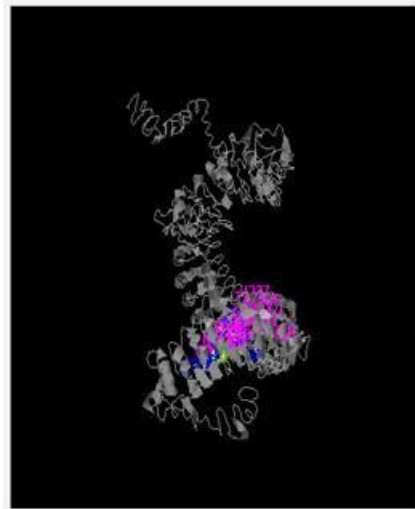


Top 10 Identified structural analogs in PDB

Click to view	Rank	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^b	Cov	Alignment
	1	4nn8A	0.726	1.46	0.301	0.738	Download
	2	5gr8A	0.617	3.48	0.266	0.675	Download
	3	5hyzB	0.564	3.22	0.285	0.609	Download
	4	5ixcA	0.553	2.76	0.320	0.584	Download
	5	4j0mA	0.549	4.17	0.228	0.620	Download
	6	3rgxA	0.528	4.70	0.202	0.614	Download
	7	5gijB	0.519	3.54	0.233	0.564	Download
	8	4z63A	0.487	3.95	0.185	0.540	Download
	9	4z5wA	0.477	3.81	0.238	0.528	Download
	10	5h64A	0.455	7.63	0.055	0.637	Download

(a) Query structure is shown in cartoon, while the structural analog is displayed using backbone trace.
(b) Ranking of proteins is based on TM-score of the structural alignment between the query structure and known structures in the PDB library.
(c) RMSD^a is the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align.
(d) IDEN^b is the percentage sequence identity in the structurally aligned region.
(e) Cov represents the coverage of the alignment by TM-align and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

Ligand binding sites

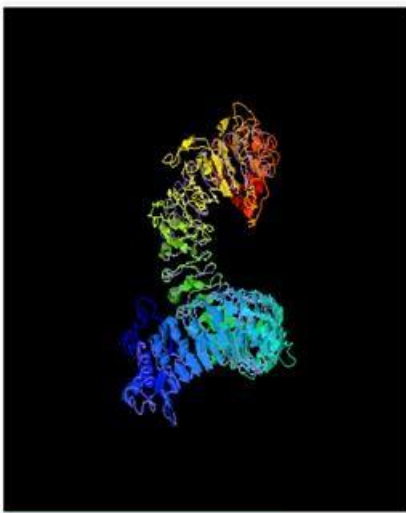


Click to view	Rank	C-score	Cluster size	PDB Hit	Lig Name	Download Complex	Ligand Binding Site Residues
	1	0.05	5	4z5wA	PEPTIDE	Rep. Mult.	92, 115, 116, 137, 139, 140, 161, 163, 188, 210, 212, 213, 232, 234, 236, 237, 256
	2	0.03	2	3fxiA	NAG	Rep. Mult.	533, 534, 555, 579
	3	0.03	3	4qc0B	XG1	Rep. Mult.	334, 336, 364, 366, 391, 415
	4	0.02	2	4r08A	UCG	Rep. Mult.	135, 158, 159, 161, 186, 188
	5	0.02	2	5awbA	MOA	Rep. Mult.	237, 239, 263, 288, 312

[Download](#) the residue-specific ligand binding probability, which is estimated by SVM.
[Download](#) the all possible binding ligands and detailed prediction summary.
[Download](#) the templates clustering results.

(a) C-score is the confidence score of the prediction. C-score ranges [0-1], where a higher score indicates a more reliable prediction.
(b) Cluster size is the total number of templates in a cluster.
(c) Lig Name is name of possible binding ligand. Click the name to view its information in [the BioLiP database](#).
(d) Rep is a single complex structure with the most representative ligand in the cluster, i.e., the one listed in the Lig Name column.
Mult is the complex structures with all potential binding ligands in the cluster.

Anexo 11: Resultado do I-Tasser para a proteínas CsLRR-RK, onde são mostradas as 10 proteínas do PDB mais próximas a proteína em questão, assim como cinco prováveis sítios de ligação na proteína.

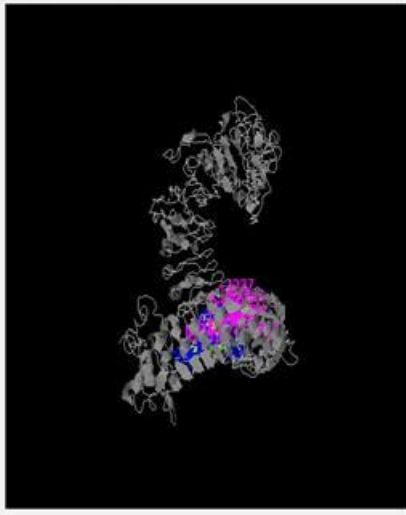


Top 10 Identified structural analogs in PDB

Click to view	Rank	PDB Hit	TM-score	RMSD ^a	IDEN ^d	Cov	Alignment
	1	4mn8A	0.727	1.75	0.301	0.741	Download
	2	5gr8A	0.616	3.48	0.276	0.674	Download
	3	5hyxB	0.564	3.23	0.269	0.610	Download
	4	4j0mA	0.553	4.14	0.222	0.622	Download
	5	3rgxA	0.528	4.94	0.194	0.620	Download
	6	5gr9B	0.509	3.65	0.180	0.557	Download
	7	5ixxA	0.507	3.65	0.260	0.555	Download
	8	4z63A	0.494	3.78	0.264	0.548	Download
	9	4z5wA	0.478	3.86	0.234	0.530	Download
	10	1u6gC	0.472	7.11	0.052	0.634	Download

(a) Query structure is shown in cartoon, while the structural analog is displayed using backbone trace.
(b) Ranking of proteins is based on TM-score of the structural alignment between the query structure and known structures in the PDB library.
(c) RMSD^a is the RMSD between residues that are structurally aligned by TM-align.
(d) IDEN^d is the percentage sequence identity in the structurally aligned region.
(e) Cov represents the coverage of the alignment by TM-align and is equal to the number of structurally aligned residues divided by length of the query protein.

Ligand binding sites



Click to view	Rank	C-score	Cluster size	PDB Hit	Lig Name	Download Complex	Ligand Binding Site Residues
	1	0.07	6	4z63A	PEPTIDE	Rep. Mult.	115,116,137,139,161,163,186,188,189,210,212,213,232,234,236,237,256
	2	0.05	3	3fxIA	NAG	Rep. Mult.	579,581,603,605
	3	0.05	4	4r07A	UCG	Rep. Mult.	134,135,158,159,161,183,186,188
	4	0.04	3	3w3IB	RX8	Rep. Mult.	364,366,389,391,415,439
	5	0.04	3	5awdA	IDQ	Rep. Mult.	239,261,264,288,312

[Download](#) the residue-specific ligand binding probability, which is estimated by SVM.
[Download](#) the all possible binding ligands and detailed prediction summary.
[Download](#) the templates clustering results.

(a) C-score is the confidence score of the prediction. C-score ranges [0-1], where a higher score indicates a more reliable prediction.
(b) Cluster size is the total number of templates in a cluster.
(c) Lig Name is name of possible binding ligand. Click the name to view its information in [the BioLiP database](#).
(d) Rep is a single complex structure with the most representative ligand in the cluster, i.e., the one listed in the Lig Name column.
Mult is the complex structures with all potential binding ligands in the cluster.

Anexo 12: Declaração de Bioética

Formulário de Proposta de Projeto à Comissão de Biossegurança (CIBio)

Título do Projeto de Pesquisa: Receptores LRR-RLK associados ao reconhecimento de PAMPs para o aumento da resistência a doenças bacterianas em citros.	
Data prevista de início: 01/03/2015	Data prevista de conclusão: 01/08/2019
Pesquisador Principal: Alessandra Alves de Souza	
Endereço: Rod. Anhanguera km 158 cep 13490970 Cordeirópolis-SP	
e-mail: alessandra@centrodecitricultura.br	Telefone residencial: 19-35464912
Material genético incluído no OGM: Gene <i>EFR</i> , proveniente de <i>Arabidopsis thaliana</i> , sob controle do promotor constitutivo 35S e fusionado com o gene repórter <i>gfp</i> . Gene <i>EFR</i> , proveniente de <i>A. thaliana</i> , sob controle do promotor constitutivo FMV. Gene <i>CleLRR-RLK</i> , proveniente de <i>Citrus reticulata</i> , sob controle do promotor constitutivo FMV.	
Vetores: Vetor pEarleyGate103 - gene de resistência a canamicina e ao herbicida BASTA (fosfotricina). Vetor sintético A595p9ioGusi-EFRcle - gene de resistência a espectinomicina, estreptomicina e canamicina e gene repórter <i>gus</i> . Vetor sintético A593p9ioGusi-EFRara - gene de resistência a espectinomicina, estreptomicina e canamicina e gene repórter <i>gus</i> .	
Classificação do OGM: Classe 1 ☒ Classe 2 ☐	
Classificação do Nível de Biossegurança do Laboratório NB - 1 ☒ NB - 2 ☐ NB - 3 ☐ NB - 4 ☐	
Resumo do Projeto A cultura dos citros no estado de São Paulo se destaca como uma das mais importantes para o agronegócio brasileiro. Entretanto, a produtividade dos pomares é baixa devido principalmente aos problemas fitossanitários. A clorose variegada de citros (CVC) e o cancro cítrico estão entre as principais doenças bacterianas que causam grande impacto na citricultura nacional, sendo causadas pela <i>Xylella fastidiosa</i> e <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i> , respectivamente. Essas doenças afetam todas as variedades comerciais de laranja doce, podendo levar a quedas na produção de até 80 %. Embora os patógenos apresentem distintas estratégias para infecção, na maioria das vezes os hospedeiros conseguem se defender utilizando a imunidade inata. O grande número de receptores presentes na superfície das células vegetais permite que as plantas reconheçam padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e desencadeiem as diferentes respostas adaptativas de defesa. <i>Receptor-like kinases</i> (RLKs) constituem uma grande família de proteínas transmembranas capazes de atuar em distintos processos celulares, incluindo o reconhecimento de patógenos nas interações planta-micróbio. O receptor de EF-Tu (EFR), identificado em membros de Brassicaceae, é uma RLK com domínio extracelular de repetições ricas em leucina (LRR-RLK) que é capaz de reconhecer estruturas conservadas da proteína EF-Tu em um grupo de bactérias patogênicas e, assim, desencadear respostas de imunidade inata. A transferência do receptor EFR para outras espécies de plantas foi capaz de conferir resistência a bactérias que eram patogênicas nas espécies avaliadas, demonstrando que esse receptor confere resistência de amplo espectro. Desta forma, um dos objetivos desse projeto, que será feito em colaboração com o Dr. Cyril Zipfel do The Sainsbury Laboratory TSL-UK, é transferir o receptor EFR (derivado de <i>Arabidopsis thaliana</i>) para genótipos de citros e avaliar o possível efeito desse receptor no reconhecimento de EF-Tu de <i>X. fastidiosa</i> e <i>X. citri</i> e, consequentemente, desencadear resistência ou tolerância a doença. Adicionalmente, verificamos em outro estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, que o receptor CleRLK-LRR foi altamente induzindo em <i>C. reticulata</i> (resistente a <i>X. fastidiosa</i>) quanto infectado com a bactéria, sugerindo que o receptor pode	

reconhecer esse patógeno e desencadear a resposta de resistência nessa espécie. Desta forma, este trabalho também tem como objetivo transferir o receptor CleRLK-LRR de *C. reticulata* para *C. sinensis*, visando aumentar o entendimento dessa proteína e sua relação com os mecanismos de defesa da planta contra patógenos.

Objetivo do Projeto

Analisar o papel de dois receptores PRRs (EFR e CleLRR-RLK) no reconhecimento de PAMPs de *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri* no desencadeamento de resposta de defesa em *Citrus sinensis*.

O trabalho em contenção objetiva a liberação posterior para o meio ambiente?

Sim ☐

Não ☒

Equipe (nome, função - incluir pesquisadores e equipes de apoio)

Dra. Alessandra Alves de Souza – Pesquisadora

Letícia Kuster Mitre – Doutoranda

Assinatura do presidente da CIBio:

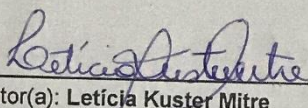


Anexo 13: Declaração de direitos autorais**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Receptores LRR-RK associados ao reconhecimento de PAMPs para o aumento a resistência a doenças bacterianas de citros**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 11 de março de 2020

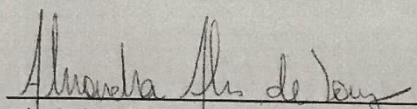
Assinatura :



Nome do(a) autor(a): **Letícia Kuster Mitre**

RG n.º 2332904

Assinatura :



Nome do(a) orientador(a): **Alessandra Alves de Souza**

RG n.º 3533370

Alessandra Alves de Souza
Pesquisador Científico VI
RS/PV 13.023.652-01