



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

DIOGO MACIEL DE MAGALHÃES

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE LRR-RLKs EM *CITRUS* E O
ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR DE EF-Tu NO
RECONHECIMENTO DE *Xylella fastidiosa*

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *CITRUS* LRR-RLKs AND
THE INVOLVEMENT OF EF-Tu RECEPTOR IN *Xylella*
fastidiosa RECOGNITION

CAMPINAS

2016

DIOGO MACIEL DE MAGALHÃES

Análise filogenética de LRR-RLKs em *Citrus* e o envolvimento do receptor de EF-Tu no reconhecimento de *Xylella fastidiosa*

Phylogenetic analysis of *Citrus* LRR-RLKs and the involvement of EF-Tu receptor in *Xylella fastidiosa* recognition

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutor 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 Genetic and Molecular Biology, in the Area of Genetics and Plant Breeding.

Orientador: ALESSANDRA ALVES DE SOUZA

Co-Orientador: MARCO AURÉLIO TAKITA

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2013/01412-0

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

M27a Magalhães, Diogo Maciel, 1981-
Análise filogenética de LRR-RLKs em *Citrus* e o envolvimento do receptor de EF-Tu no reconhecimento de *Xylella fastidiosa* / Diogo Maciel de Magalhães. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

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

1. Filogenia. 2. Proteína EFR, *Arabidopsis*. 3. Padrões moleculares associados a patógenos. 4. *Arabidopsis*. 5. Tabaco. I. Souza, Alessandra Alves de. II. Takita, Marco Aurélio. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Phylogenetic analysis of *Citrus* LRR-RLKs and the involvement of EF-Tu receptor in *Xylella fastidiosa* recognition

Palavras-chave em inglês:

Phylogeny
EFR protein, *Arabidopsis*
Pathogen-associated molecular pattern molecules
Arabidopsis
Tobacco

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Alessandra Alves de Souza [Orientador]
Cláudia Barros Monteiro Vitorello
Michel Georges Albert Vincentz
Renato Vicentini dos Santos
Ronaldo José Durigan Dalio

Data de defesa: 12-08-2016

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 12 de Agosto de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Alessandra Alves de Souza

Dra. Cláudia Barros Monteiro Vitorello

Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Dr. Renato Vicentini dos Santos

Dr. Ronaldo José Durigan Dalio

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

À minha mãe, a principal referência de
dignidade, solidariedade e amor em
minha vida,

ofereço

Ao meu irmão Thiago, pelo amor
fraterno incondicional que nunca
poupou e pelo apoio em todos os
momentos de insegurança,

dedico

AGRADECIMENTOS

Inicialmente e acima de tudo, agradeço à Deus por me proporcionar saúde e todas as demais condições necessárias para o desenvolvimento dessa Tese. Obrigado por estar sempre presente, me guiando e fortalecendo em todos os momentos da minha vida.

À UNICAMP e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Processo nº 2013/01412-0) pelo apoio financeiro e institucional que tornou possível o desenvolvimento dessa Tese.

À Alessandra, minha orientadora, principalmente por nunca desistir de mim. Além de ser uma pesquisadora indiscutível quanto à excelência de ideias e trabalhos, é uma ótima orientadora e pessoa. Reconheço todos os seus esforços e agradeço sinceramente pela grande contribuição na minha formação. Hoje, mais que seu orientado eu sou um grande fã.

Ao Takita, pelos ensinamentos e discussões que foram de grande importância para uma melhor compreensão e desenvolvimento do trabalho.

À Larissa e ao Dr. Guilherme do CEBIO, pela colaboração nos trabalhos envolvendo filogenia molecular.

Ao Dr. Zipfel do TSL (The Sainsbury Laboratory) pela colaboração nos trabalhos envolvendo as análises funcionais relacionadas ao EFR, fundamental para a execução de parte desta Tese.

Ao pessoal do grupo *Xylella/Xanthomonas*, nosso grupo de pesquisa, pelas inúmeras discussões que possibilitaram melhorar diversos pontos do trabalho.

À minha mãe que, com todo seu amor e afeto, sempre me confortou com palavras e gestos de carinho. Não existe para mim uma pessoa mais surpreendente.

Ao meu Pai, símbolo maior de sabedoria e que me deu apoio em todas as etapas da minha vida. Obrigado pela excelente educação que me proporcionou e por ser um pai tão presente e maravilhoso.

Ao meu irmão Thiago, por me ouvir, me apoiar, me instruir e me alegrar durante toda a minha vida. Deixo aqui um sincero agradecimento, pois como um bom irmão mais velho, você sempre me protegeu e cuidou de mim. Muito obrigado!

À Gabi, minha namorada querida, pelas inúmeras discussões científicas que ajudaram a compreender melhor até mesmo meu próprio trabalho. Obrigado por me aguentar, me apoiar e por me fazer feliz todos os dias.

Ao Bruno, que cada vez mais comprova e reforça nossos laços fraternos. É uma pessoa inteligente e de bom coração que sempre me apoiou.

Ao Ronaldo, um grande amigo que além de estudar e morar comigo em república durante a faculdade, por acaso também acabou desenvolvendo atividades no mesmo laboratório que desenvolvi os trabalhos dessa Tese. Agradeço pelas discussões e apoio que deu ao trabalho.

À minha grande amiga Simone, que além de discussões científicas, me proporcionou também momentos de alegria e descontrações nos inúmeros momentos de confraternização.

Agradeço também ao pessoal da salinha de Pós-graduação, em especial aos amigos Willian, Bárbara, Fiotão, Carol e Marquinhos que além de me ajudarem em diversas etapas do trabalho, também foram importantes para manter o alto astral no dia-dia.

À Rose, Anita e Amélia, pelos descontraídos momentos na cozinha do laboratório e que foram também importantes para execução dos trabalhos.

Aos meus amigos da vida toda (Arnaldo, Lucas, Jansem, Rui, Ricky, André, Nenê, Guiga, Pato, Cavalinho, Dossoaldo...) que independente do momento da minha vida, sei que sempre estarão lá para me apoiar.

Ao Súlío e ao Malaco, grandes amigos conquistados durante o período da faculdade. Apesar de não nos encontrarmos com frequência, nunca deixaram de me apoiar e serei sempre agradecido.

Ao Lucas, Karina e Priscila pelo convívio e pela amizade cada vez mais crescente e sincera.

A todos os pesquisadores, estudantes e funcionários do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citros APTA Sylvio Moreira que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) apresentam grande importância na defesa das plantas contra microrganismos pela capacidade de reconhecerem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) em início de infecção e desencadearem respostas de imunidade inata (PTI). A ativação de PTI permite conferir resistência contra uma ampla gama de microrganismos e, assim, a identificação e compreensão do papel das PRRs é de grande relevância em estudos que visam resistência contra patógenos. As espécies de *Citrus* apresentam elevado interesse comercial, porém seu cultivo tem sido severamente prejudicado devido às inúmeras doenças causadas por fitopatógenos, como por exemplo, a clorose variegada dos citros causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*. Assim, considerando que a maioria das PRRs identificadas em plantas pertence à família de quinases com repetições ricas em leucina (LRR-RLKs), um dos objetivos desse trabalho foi analisar os aspectos evolutivos das LRR-RLKs no genoma de espécies de *Citrus* de grande importância econômica, *Citrus clementina* e *Citrus sinensis*. O alinhamento múltiplo de sequências conservadas de quinase e a reconstrução de árvores filogenéticas estimadas por máxima verossimilhança permitiu identificar 300 e 297 LRR-RLKs nos proteomas preditos de *C. clementina* e *C. sinensis*, respectivamente. As LRR-RLKs de ambas as espécies foram classificadas em 16 subgrupos (I a XVI) e a partir de uma análise mais detalhada do subgrupo XII, que inclui os principais PRRs identificados em plantas, foi verificada uma grande expansão e clusterização nos genomas de *Citrus*, o que demonstra a importância de eventos de duplicação em tandem na evolução das LRR-XII em *Citrus*. Além das análises *in silico*, neste trabalho também foi avaliado o papel do receptor de EF-Tu (EFR) no reconhecimento de *X. fastidiosa*. Mutantes de *Arabidopsis thaliana* com EFR silenciado (*efr-1*) foram inoculados com *X. fastidiosa* e, a partir de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), foi verificado um aumento significativo da população bacteriana em *efr-1* durante todo o experimento, quando comparado com as plantas selvagens (WT). Em 15 dias após inoculação (DAI), foi observada uma população bacteriana quase dez vezes maior nos tecidos das plantas *efr-1*. Análises por microscopia de fluorescência confirmaram a elevada colonização bacteriana nos tecidos das plantas *efr-1*. A importância do EFR no reconhecimento de *X. fastidiosa*

foi avaliada também pela superexpressão de *AtEFR* em plantas hospedeiras de tabaco, as quais apresentam susceptibilidade a *X. fastidiosa*. Vinte plantas transgênicas foram identificadas por PCR convencional e a expressão do transgene *EFR* foi confirmada em seis eventos por qRT-PCR. Análises por western blot confirmaram a presença da proteína heteróloga e a maior produção de ROS verificada em presença dos epítomos elf18 de *X. fastidiosa*, *E. coli* e *Xanthomonas citri subsp. citri* indicam ativação de PTI nas plantas transgênicas de tabaco. A redução significativa na incidência de sintomas nas plantas transgênicas inoculadas com *X. fastidiosa* demonstra que EFR conferiu ao tabaco maior resistência à infecção bacteriana. Os resultados obtidos em Arabidopsis e tabaco indicam que EFR pode ser uma boa estratégia para transformar espécies susceptíveis de *Citrus* visando resistência contra *X. fastidiosa* e *X. citri*.

Palavras-chave: Filogenia, EFR, PAMP, Arabidopsis, Tabaco

ABSTRACT

Pattern recognition receptors (PRRs) are very important in plant defense against microorganisms because they are able to recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in early infection process triggering innate immune responses (PTI). Activation of PTI confers resistance against a wide range of microorganisms and studies involving the identification and functional role of PRRs are of great importance. Citrus crops have great commercial importance worldwide; however, the productivity has decreased due to several diseases that affect this culture, such as citrus variegated chlorosis, caused by *Xylella fastidiosa*. Since most identified PRRs in plants belong to the leucine-rich repeat receptor-like kinases family (LRR-RLKs), one of the goals of this study was to analyze the evolutionary aspects of LRR-RLKs in economically important citrus species, *Citrus clementina* and *Citrus sinensis*. The multiple alignment of conserved kinase sequences and the reconstruction of phylogenetic trees estimated by maximum-likelihood identified 300 and 297 LRR-RLKs in the predicted proteomes of *C. clementina* and *C. sinensis* species, respectively. The LRR-RLKs from both species were classified into 16 sub-groups (I to XVI) and further analysis in the subgroup XII, which includes the main PRRs identified in plants, showed a large expansion and clustering in the Citrus genome, which demonstrates the importance of tandem duplication in the evolution of LRR-XII in Citrus. In addition to the *in silico* analysis, in this study we also evaluated the role of EF-Tu receptor (EFR) in the recognition of *X. fastidiosa*. *Arabidopsis thaliana efr-1* mutants were inoculated with *X. fastidiosa*, and using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) we verified a significant increase of bacterial population in *efr-1*, during the time-course of infection, compared to the wild type (WT). At 15 days after inoculation (DAI) the bacterial population was almost ten times more in the *efr-1* tissues in relation to WT. Fluorescence microscopy analysis confirmed the high bacterial colonization in the tissues of *efr-1* plants. The importance of EFR in *X. fastidiosa* recognition was also evaluated by the overexpression of *AtEFR* in tobacco host plants, which are susceptible to *X. fastidiosa*. Twenty transgenic events were identified by conventional PCR and the expression of the *EFR* transgene was confirmed in six lines by qRT-PCR. Western blot analysis confirmed the presence of the heterologous protein and the increased ROS production observed in the

presence of elf18 epitopes from *X. fastidiosa*, *E. coli* and *Xanthomonas citri* subsp. *citri* indicate PTI activation in the tobacco transgenic plants. The significant reduction in the incidence of symptoms in transgenic plants inoculated with *X. fastidiosa* showed that EFR increased the tolerance against the bacteria infection. The results obtained from *A. thaliana* and tobacco indicate that EFR could be a good strategy to transform *Citrus* plants aiming *X. fastidiosa* and *X. citri* resistance.

Keywords: Phylogeny, EFR, PAMP, Arabidopsis, Tobacco

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ABRC</i>	<i>Arabidopsis biological resource center</i>
<i>ARPC3</i>	<i>Actin-related protein C3</i>
<i>BAP</i>	<i>Benzyl aminopurine</i>
<i>BP</i>	<i>Border (T-DNA) primer</i>
<i>BSA</i>	<i>Albumina de soro bovino</i>
<i>CaMV</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
<i>cDNA</i>	<i>DNA complementar</i>
<i>CDS</i>	<i>Coding sequence</i>
<i>CTAB</i>	<i>Cetyl trimethyl ammonium bromide</i>
<i>CVC</i>	<i>Clorose variegada dos citros</i>
<i>DAI</i>	<i>Dias após inoculação</i>
<i>DAMP</i>	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>DNase</i>	<i>Desoxiribonuclease</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
<i>EFR</i>	<i>Ef-Tu receptor</i>
<i>Ef-Tu</i>	<i>Elongation factor thermo unstable</i>
<i>ETI</i>	<i>Effector-triggered Immunity</i>
<i>ETS</i>	<i>Effector-triggered susceptibility</i>
<i>FLS2</i>	<i>Flagellin-sensing 2</i>
<i>GFP</i>	<i>Green fluorescent protein</i>
<i>HAMP</i>	<i>Herbivore-associated molecular pattern</i>
<i>HCl</i>	<i>Ácido clorídrico</i>
<i>HLB</i>	<i>Huanglongbing</i>
<i>HR</i>	<i>Hypersensitive response</i>
<i>KCl</i>	<i>Cloreto de potássio</i>
<i>LP</i>	<i>Left primer</i>

<i>LRR-RLK</i>	<i>Leucine-rich repeat receptor-like kinase</i>
<i>MAMP</i>	<i>Microbial-associated molecular pattern</i>
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<i>NBS-LRR</i>	<i>Nucleotide binding site-leucine-rich repeat</i>
<i>OCS</i>	<i>Octopina sintase</i>
<i>PAMP</i>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PRR</i>	<i>Pattern recognition receptors</i>
<i>PTI</i>	<i>PAMP/Pattern-triggered immunity</i>
<i>PVP</i>	<i>Polivinilpirrolidona</i>
<i>qRT-PCR</i>	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i>
<i>RNA</i>	<i>Ácido ribonucléico</i>
<i>RNase</i>	<i>Ribonuclease</i>
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxygen species</i>
<i>RP</i>	<i>Right primer</i>
<i>RTX</i>	<i>Repeats in toxin</i>
<i>SAR</i>	<i>Systemic acquired response</i>
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<i>T3SS</i>	<i>Type III secretion system</i>
<i>TAIR</i>	<i>The Arabidopsis information resource</i>
<i>TBS</i>	<i>Tris-buffered saline</i>
<i>Tuf</i>	<i>Translation unstable factor</i>
<i>T-DNA</i>	<i>DNA de transferência</i>
<i>Tris</i>	<i>Tris-hidroximetil-aminometano</i>
<i>VAMP</i>	<i>Virus-associated molecular pattern</i>
<i>WT</i>	<i>Wild type</i>
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas citri pv. citri</i>
<i>Xf</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>

XLB

Xylem-limited bacteria

Xoo

Xanthomonas oryzae pv. oryzae

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
INTRODUÇÃO GERAL	18
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1. Citros: Aspectos Gerais e Importância Econômica	18
1.2. Os Problemas Fitossanitários da Citricultura e a CVC	20
1.3. Os Mecanismos de Patogenicidade da <i>Xylella fastidiosa</i>	22
1.4. O Sistema de Imunidade Inata das Plantas	23
1.5. Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases: LRR-RLKs	27
1.6. Plantas-Modelo em Estudos de Genômica Funcional	29
2. JUSTIFICATIVA	30
3. REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 1 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DE LRR-RLKs EM CITRUS	43
1. OBJETIVOS	43
1.1. OBJETIVO GERAL	43
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BMC GENOMICS	44
2. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1	59
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS DO CAPÍTULO 1	59
CAPÍTULO 2 - ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR EFR NO RECONHECIMENTO DE PAMP DE <i>Xylella fastidiosa</i> EM PLANTAS-MODELO	61
1. INTRODUÇÃO	61
2. HIPÓTESES	67
3. OBJETIVOS	67
3.1. OBJETIVOS GERAIS	67
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	68
4. MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes para EFR	69
4.2. Seleção de <i>Arabidopsis thaliana efr-1</i> em homozigose	70
4.3. Condições experimentais da interação entre <i>X. fastidiosa</i> e <i>A. thaliana</i>	70
4.4. Quantificação de <i>X. fastidiosa</i> nos tecidos de <i>A. thaliana</i>	71
4.5. Avaliação de sintomas em <i>A. thaliana</i> inoculadas com <i>X. fastidiosa</i>	71
4.6. Superexpressão de <i>EFR</i> em <i>Nicotiana tabacum</i>	72
4.7. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS)	77
4.8. Avaliação de sintomas nas plantas selvagens e transgênicas de <i>Nicotiana tabacum</i> superexpressando <i>EFR</i>	78

5.	RESULTADOS	81
5.1.	Seleção de homocigotos em mutantes <i>efr-1</i> de <i>A. thaliana</i>	81
5.2.	Quantificação de <i>X. fastidiosa</i> nos tecidos de <i>A. thaliana</i> por qRT-PCR	84
5.3.	Deteção de <i>X. fastidiosa</i> nos tecidos de <i>A. thaliana</i> por Microscopia de fluorescência	86
5.4.	Sintomas em <i>A. thaliana</i> desafiadas com <i>X. fastidiosa</i>	87
5.5.	Determinação de ROS nos tecidos de <i>A. thaliana</i>	90
5.6.	Identificação de plantas transgênicas de <i>Nicotiana tabacum</i>	93
5.7.	Nível de expressão de <i>EFR</i> por nas plantas transgênicas de <i>Nicotiana tabacum</i>	95
5.8.	Deteção da proteína recombinante GFP fusionada ao EFR em plantas transformadas de <i>Nicotiana tabacum</i>	99
5.9.	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas plantas transgênicas de <i>N. tabacum</i> em resposta ao peptídeo efl18.	101
5.10.	Avaliação de sintomas em <i>N. tabacum</i> desafiado com <i>X. fastidiosa</i>	104
6.	DISCUSSÃO	117
7.	CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2	122
8.	CONSIDERAÇÕES GERAIS DO CAPÍTULO 2	123
9.	REFERÊNCIAS	124
APÊNDICE I – DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS		136
APÊNDICE II – DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA		137

INTRODUÇÃO GERAL

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Citros: Aspectos Gerais e Importância Econômica

O termo Citros é designado a um conjunto grande e heterogêneo de plantas frutíferas que são normalmente pertencentes ao gênero *Citrus*, mas também estão presentes em gêneros relacionados. A complexidade botânica observada entre as espécies que compõem esse grupo dificulta uma precisa classificação taxonômica e diversos sistemas têm sido propostos com base, por exemplo, em características morfológicas, bioquímicas ou moleculares (BARRET & RHODES, 1976; HANDA et al., 1986; MOORE 2001). Os principais sistemas de classificação são os propostos por Swingle (1943), e que posteriormente foi revisado por Swingle e Reece em 1967, onde consideram apenas 16 espécies no gênero *Citrus*, e o sistema sugerido por Tanaka (1977) que inclui um número muito superior de 162 espécies neste gênero. Apesar de diversos pesquisadores utilizarem abordagens próprias para entender a taxonomia de *Citrus* e examinar suas relações filogenéticas, o sistema considerado por Swingle e Reece (1977) ainda é o mais utilizado (GARCIA-LOR et al., 2012). Por este sistema, Swingle Reece reconhecem como “verdadeiras frutíferas cítricas (*true citrus fruit trees*) ” apenas um grupo de plantas que produz frutos parecidos com laranjas e limões. Neste grupo são incluídos seis gêneros correlacionados presentes na subfamília Aurantioideae (família Rutaceae): *Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* e *Clymenia*. A maioria dos indivíduos presente no grupo das “verdadeiras frutíferas cítricas” apresenta um longo período evolutivo e de cultivo onde se verifica compatibilidade sexual mesmo entre espécies de gêneros distintos. Características como essas levaram ao surgimento de inúmeros híbridos intra e interespecíficos que contribuiriam ainda mais para a complexidade sistemática do grupo (CHAPOT, 1975; GUO & DENG, 2001).

Apesar de serem extensivamente estudadas devido sua relevância comercial, a origem das espécies cultivadas de *Citrus* e sua história de domesticação ainda não são completamente compreendidas. Contudo, apesar de heterogêneo e complexo, sugere-se que todas as espécies e híbridos cultivados de

Citrus tenham evoluído a partir de apenas três principais espécies ancestrais: *C. máxima*, *C. medica* e *C. reticulata* (VELASCO & LICCIARDELLO, 2014).

As espécies de plantas cítricas de maior interesse comercial estão presentes principalmente nos gêneros *Citrus*, *Poncirus* e *Fortunella*, sendo o gênero *Citrus* o que inclui as espécies de importância mais expressiva (TALON & GMITTER, 2008). Os principais exemplos de frutas cítricas presentes em *Citrus* com interesse comercial são as laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osb.), as tangerinas (*C. reticulata* e *C. clementina*), as laranjas azedas (*C. aurantium* L.), os pomelos (*C. paradisi* Macf.), as toranjas (*C. grandis* Osb.), as limas ácidas (*C. aurantifolia* Swing.), as limas doces (*C. limettioides* Tan.), os limões (*C. limon* Burm.) e as cidras (*C. medica* L.). Enquanto em *Fortunella* o Kumquat (*F. margarita* Swingle ou *F. japônica*) se destaca pelos frutos pequenos e saborosos, no gênero *Poncirus*, o principal destaque é o trifoliata (*P. trifoliata* L.), cujo interesse principal é o uso como porta-enxerto, principalmente por conferir às combinações copa/porta-enxerto características de interesse agrônomo. Indivíduos de menor porte e resistência contra a gomose causada pela *Phytophthora* sp. e ao vírus da tristeza são algumas das características de interesse dos produtores ao utilizar *P. trifoliata* como porta-enxerto nas combinações (TALON & GMITTER, 2008).

Embora sejam encontrados indivíduos naturalmente triploides e tetraploides, as espécies de *Citrus* e dos gêneros relacionados são em geral constituídas por indivíduos diploides que apresentam número cromossômico $2n = 18$, (MOREIRA & PIO, 1991).

A maior parte das plantas de *Citrus* possui porte médio, atingindo cerca de 4 metros de altura, e uma densa copa que apresenta folhas e flores normalmente bastante aromáticas. Os frutos cítricos são em geral saborosos, ricos em vitamina C e concentram o maior interesse agrícola e comercial, principalmente pela possibilidade de extração de suco, que para a maioria das espécies representa o produto mais valioso. Além disso, até mesmo a casca de frutos como limão e laranja podem ser aproveitados pois constituem ricas fontes de óleos essenciais e apresentam grande potencial de aplicação em diversos setores do mercado, como o de cosméticos, bebidas, culinária e mesmo no combate a microrganismos e ervas daninhas (VERZERA et al., 2003; MANDALARI et al., 2007; SHARMA & TRIPATHI, 2006; NAVARRA et al., 2015; SANCHÉZ-GONZÁLEZ et al., 2010).

Cultivadas em praticamente todos os lugares do mundo, as espécies de citros estão entre as principais frutíferas difundidas e alcançam uma produção mundial média superior a 130 milhões de toneladas ao ano. China, Estados Unidos e Brasil respondem por mais da metade da produção mundial que se restringe principalmente a laranjas, tangerinas, limões, limas e pomelos (FAO, 2014).

A citricultura ocupa papel de grande importância social e econômica principalmente em países como o Brasil, onde o setor do agronegócio como um todo representa cerca de 23 % do PIB nacional, o que corresponde a mais de R\$ 1,3 trilhão ao ano (CNA, 2016). E por apresentar características como elevado valor nutricional, alto teor de vitamina C e um peculiar sabor doce e ácido apreciado na maior parte do mundo, a laranja representa a fruta cítrica de maior interesse comercial. O Brasil produziu mais de 16 milhões de toneladas de laranja na última safra e, com esse número que é equivalente a mais de 30 % da produção mundial, o Brasil novamente garante o posto de maior produtor mundial de laranjas, posição que é mantida desde o início da década de 90 (IBGE, 2016; FAO, 1998).

A região que engloba o Estado de São Paulo e o Triângulo Mineiro, conhecida como "*Citrus belt*", representa o maior parque citrícola do mundo e é normalmente responsável por cerca de 80 % da produção nacional de laranjas. Os integrantes desta cadeia produtiva, em conjunto com as empresas e indústrias de processamento de suco da região, contribuem para que o Brasil produza mais da metade do suco de laranja do mundo e alcance um faturamento anual entre 1,5 e 2,5 bilhões de dólares com as exportações deste que representa o produto da citricultura, (NEVES et al., 2011; ZULIAN et al., 2013).

1.2. Os Problemas Fitossanitários da Citricultura e a CVC

Apesar da organização e competitividade do setor citrícola nacional, a produtividade dos pomares é considerada baixa, principalmente por estes serem constantemente afetados por inúmeras pragas e doenças agrícolas que causam enormes prejuízos aos produtores (MARQUES et al., 2007).

Microrganismos de praticamente toda natureza são capazes de causar doenças relevantes em espécies de citros, incluindo principalmente o huanglongbing (HLB), a clorose variegada de citros (CVC) e o cancro cítrico como doenças bacterianas; a podridão floral, a pinta preta, a alternaria e a gomose causadas por

fungos e oomicetos; além da leprose e a tristeza que são doenças de origem viral que acometem a citricultura. Os problemas fitossanitários são agravados ainda mais se forem consideradas as inúmeras pragas que acometem os pomares das principais espécies citros, como ácaros, pulgões, psílídeos, cigarrinhas, cochonilhas, larvas minadoras, moscas e dentre diversas outras que, além de prejudicarem o desenvolvimento das plantas por si só, ainda atuam como vetores na transmissão das principais doenças (TALON & GMITTER, 2008; MACHADO et al., 2011).

Conhecida popularmente como “amarelinho”, a CVC constitui uma importante doença causada pela bactéria gram-negativa *Xylella fastidiosa* que por sua vez é transmitida às plantas hospedeiras através de cigarrinhas da família *Cicadelinae*. Depois de instaladas na planta, as bactérias são capazes de se multiplicar no interior dos vasos do xilema e o crescimento em biofilme associado à produção de gomas polissacarídicas podem levar à obstrução dos vasos, prejudicando o deslocamento de água e nutrientes pela planta (ROPER et al., 2007).

Apesar de não ser uma doença de caráter tão destrutivo como o HLB, a CVC apresenta elevada importância na citricultura nacional e vem causando problemas aos citricultores desde a década de 80, quando foi detectado o primeiro caso no país. Verificada em todas as regiões citrícolas do país, a CVC constitui um problema fitossanitário de grande impacto e requer atenção, visto que afeta todas as variedades comerciais de laranja doce no Brasil. Além de tornar o fruto duro, a CVC pode causar um amadurecimento precoce e levar a uma redução de até 70 % no tamanho, tornando estes frutos pouco atrativos ao comércio principalmente pela redução na quantidade de suco concentrado disponível (De NEGRI, 1990; BOVÉ & AYRES, 2007).

A incidência de CVC no estado de São Paulo passou de 35,5 % para 40,3 % de 2010 para 2011, representando um quadro preocupante se considerar que as perdas de produção podem chegar a mais de 80 % em pomares de laranja doce severamente afetados (FUNDECITRUS, 2012). Só no Estado de São Paulo aproximadamente seis milhões de árvores eram perdidas a cada ano devido aos danos causados pela CVC (BOVÉ & AYRES, 2007).

Apesar das elevadas perdas que se tem observado desde seu surgimento, a CVC tem se mantido relativamente controlada nos pomares de citros, principalmente pelas medidas de manejo e uso de telados que favoreceram um controle mais eficaz dos insetos vetores causadores de doença. Estas medidas

favoreceram o cultivo e comercialização de mudas saudáveis que estão aos poucos renovando os pomares nacionais. Entretanto, apesar de controlada nos pomares, a CVC representa ainda uma doença de grande impacto na citricultura e inúmeros trabalhos têm sido conduzidos visando aumentar a compreensão do patossistema *citros-Xylella fastidiosa*. Os mecanismos de patogenicidade da *X. fastidiosa*, bem como das respostas de defesa das plantas acometidas por essa bactéria não são ainda totalmente compreendidas e são de grande importância no combate das doenças causadas por esse fitopatógeno.

1.3. Os Mecanismos de Patogenicidade da *Xylella fastidiosa*

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa que se apresenta na forma de bastonete e tem tamanho variável, podendo chegar a até 0,7 µm de diâmetro e 20 µm de comprimento. Trata-se de uma bactéria estritamente aeróbia que faz parte do grupo das bactérias com crescimento limitado ao xilema das plantas hospedeiras (*XLB*, de “*xylem-limited bacteria*”) onde se distribui de forma irregular, no entanto também podem ser encontradas no lúmen do canal alimentar dos insetos vetores envolvidos na transmissão da bactéria entre as plantas (PURCELL & HOPKINS, 1996; CHATTERJEE et al., 2008).

Apesar de muitas plantas não apresentarem sintomas quando infectadas com *X. fastidiosa*, estas podem atuar como hospedeiras alternativas e servir como fonte de inóculo no estabelecimento de doenças entre as plantas cultivadas de maior interesse agrônomo (LEITE et al., 1997). A *X. fastidiosa* pode causar doenças como o Mal de Pierce em videiras (*Vitis vinífera* L.), a Escaldadura foliar em ameixeiras (*Prunus salicina* Lindl), o “phony” em pessegueiros (*Prunus persicae* L.), a Atrofia de ramos ou requeima nos cafeeiros (*Coffea arabica* L.), dentre outras. A clorose variegada dos citros (CVC), entretanto, constitui a doença causada por *X. fastidiosa* que apresenta maior importância nacional, devido principalmente ao enorme prejuízo que causa ao agronegócio (BOVÉ & AYRES, 2007).

Ao se instalar na planta, a bactéria coloniza os vasos do xilema e, embora não apresente flagelos, a *X. fastidiosa* apresenta uma colonização efetiva devido a estruturas denominadas Pili Tipo IV que constituem adesinas fimbriais com papel na motilidade tipo *swimming* (LI 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 que as bactérias se desloquem de uma célula para outra nos vasos do xilema da planta hospedeira (BACCARI & LINDOW, 2011).

Apesar de não terem sido detectados genes associados ao sistema de secreção do tipo III e os genes de avirulência (*Avr*) comumente encontrados nas bactérias fitopatogênicas, no genoma de *X. fastidiosa* foram identificados fatores de virulência importantes encontrados em bactérias gram-negativas patogênicas. Estes fatores relacionam-se com a ativação, principalmente, de genes pertencentes à família de toxinas RTX. Estas toxinas são capazes de lesar ou matar as células vegetais, favorecendo ao patógeno a colonização da planta hospedeira (SIMPSON et al., 2000). Ainda, várias proteínas são secretadas, tais como: adesinas fimbriais e afimbriais (CASERTA et al., 2010), exopolissacarídeos (ROPER et al., 2007) dentre outros que podem ainda atuar como importantes fatores de patogenicidade.

1.4. O Sistema de Imunidade Inata das Plantas

As plantas são naturalmente submetidas a inúmeras condições adversas no ambiente em que vivem e, dentre elas, o ataque por pragas e patógenos. Os microrganismos apresentam distintas estratégias e mecanismos de patogenicidade para invadir e colonizar as células das plantas em busca de energia e nutrientes. Entretanto, o sucesso da infecção não é frequente devido principalmente a um elaborado mecanismo adaptativo de defesa desenvolvido pelas plantas ao longo do processo evolutivo (LUCAS, 1998; SALOMON & SESSA, 2012). O sistema de defesa das plantas tem sido moldado há milhões de anos por co-evolução com os patógenos, o que culminou no desenvolvimento de uma enorme complexidade de defesa em nível molecular (ASAI & SHIRASU, 2015).

As plantas apresentam inúmeras barreiras constitutivas pré-formadas nos tecidos, o que inclui a presença de ceras, tricomas, espinhos, cutícula, casca, compostos fenólicos e uma espessa camada de parede celular. Os microrganismos que porventura conseguem ultrapassar estas barreiras, ficam ainda sujeitos ao reconhecimento por receptores celulares capazes de ativar vias de sinalização e

respostas de defesa nas células vegetais (SENTHIL-KUMAR & MYSORE, 2013; FAN & DOERNER, 2012). As barreiras naturais constitutivas determinam um tipo de resistência conhecida como não-hospedeira (*non-host resistance*). Este tipo de defesa é muito eficaz e confere proteção duradoura e não específica contra um grande número de patógenos em potencial (UMA et al., 2011).

O mecanismo de defesa denominado imunidade inata representa a primeira linha de defesa induzida durante a invasão de patógenos e é capaz de conferir resistência contra a maioria dos microrganismos invasores do ambiente. Enquanto os animais possuem, além do sistema de imunidade inata, um complexo sistema de imunidade adaptativa representado por células moveis especializadas e um grande número de anticorpos específicos, as plantas dependem exclusivamente da imunidade inata. A partir do sistema de imunidade inata, as plantas são capazes de combater a grande maioria dos microrganismos indesejados, mesmo sendo organismos sésseis. Parte do sucesso se deve, principalmente, à rápida detecção dos invasores em potencial, além de um largo espectro de especificidades de reconhecimento por parte das proteínas receptoras presentes nas células das plantas hospedeiras (ZIPFEL, 2008; SPOEL & DONG, 2012).

As plantas inicialmente percebem a presença de microrganismos invasores a partir de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, de *Pattern Recognition Receptors*). Esses receptores são proteínas transmembranas que ficam ancoradas na superfície da membrana das células e são capazes de reconhecer perfis moleculares associados ao patógeno (PAMPS, de *pathogen-associated molecular patterns*). Os PAMPS foram inicialmente conceituados como moléculas altamente conservadas de uma classe de micróbios e que apresentam função essencial na sobrevivência ou no fitness (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; NURNBERGER & BRUNNER, 2002). Como essas moléculas também são encontradas e reconhecidas em células de microrganismos não-patogênicos, o termo alternativo *microbe-associated molecular pattern* (MAMP) também é utilizado para se referir a estas moléculas (MACKEY & MCFALL, 2006; ZIPFEL 2014; JONES & DANGL, 2006).

Com a detecção dos PAMPS/MAMPS, os PRRs desencadeiam na planta a primeira linha de resposta do sistema imune, a resistência basal denominada PTI (de *PAMP-Triggered Immunity*) (JONES & DANGL, 2006; ZIPFEL, 2009). Em situação de ataque por patógenos e outros agressores, as plantas produzem

moléculas que podem também ser reconhecidas como padrões moleculares associados a sinais de alerta ou perigo (DAMPs, de *danger-associated molecular pattern* ou *damage-associated molecular pattern*) e, de forma similar, são também capazes de desencadear as respostas PTI (YAMAGUCHI & HUFFAKER, 2011; KLAUSER et al., 2015) (Figura 1).

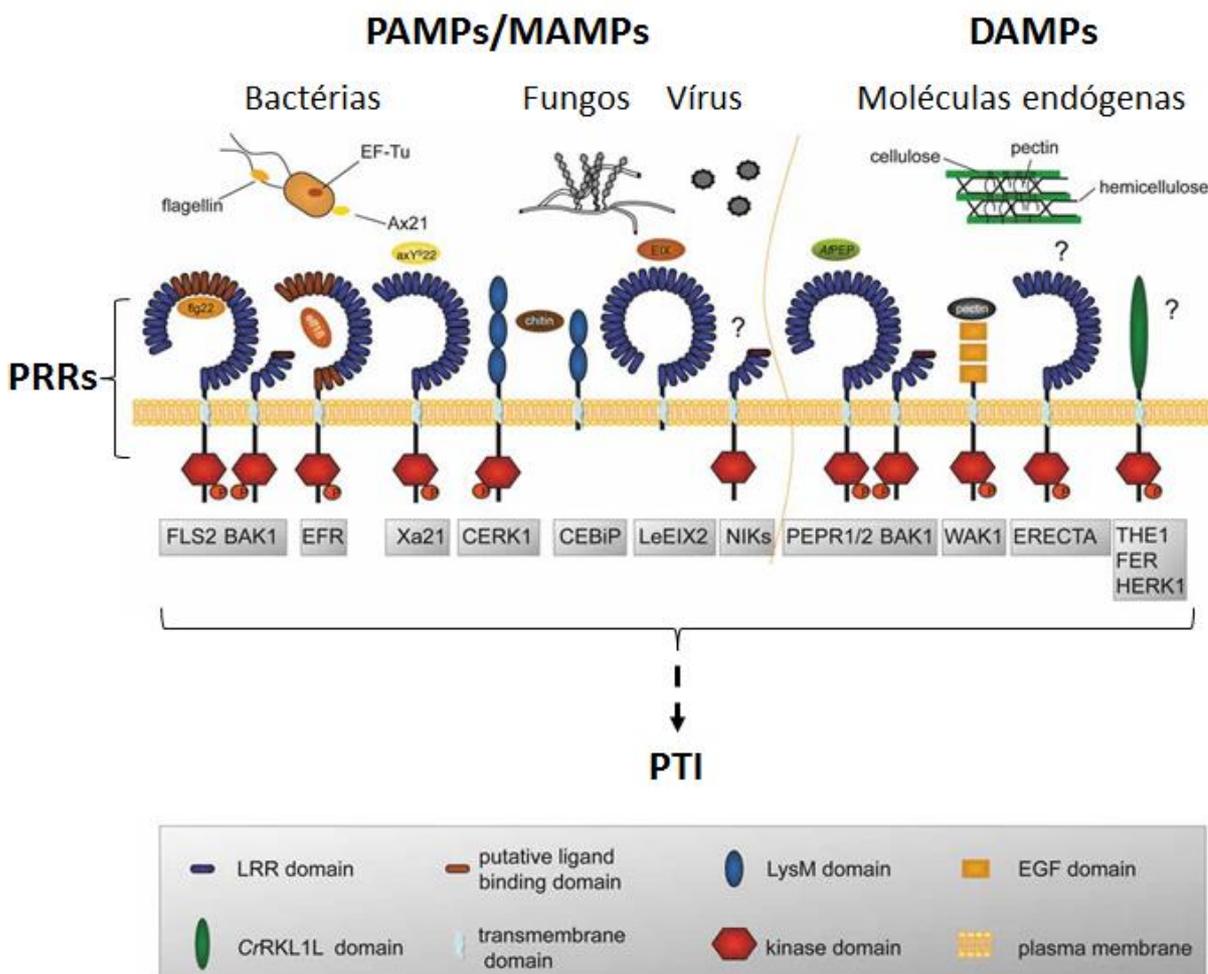


Figura 1 – Primeira linha de defesa induzida no sistema de imunidade inata das plantas. Moléculas associadas a bactérias, fungos, oomicetos e vírus (PAMPs/MAMPs), ou moléculas das próprias células vegetais produzidas em situação de perigo (DAMPs), são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) localizados na superfície das células. Com o reconhecimento dessas moléculas (PAMPs/MAMPs e DAMPs), as células rapidamente ativam o sistema de imunidade inata PTI e que corresponde a resistência basal celular. Fonte: Adaptado de Mazzotta & Kemmerling, 2011.

Além disso, considerando que as moléculas reconhecidas por PRRs podem também estar associadas a herbívoros (HAMPs, de *herbivore-associated molecular pattern*) ou mesmo a vírus (VAMPs, de *virus-associated molecular pattern*),

o termo PTI que foi inicialmente associado a PAMP (*PAMP-Triggered Immunity*) tem sido também relacionado de modo mais generalista a padrão: *Pattern-Triggered Immunity* (BOLLER & FELIX, 2009; BIGGEARD et al., 2015).

O reconhecimento de PAMPs/MAMPs e de outras moléculas associadas com perigo celular é de grande importância e representa a base do sistema de imunidade inata que, além disso, também é necessário inclusive para a ativação do sistema de imunidade adaptativa dos animais (JANEWAY JR & MEDZHITOV, 2002). As respostas PTI normalmente observadas incluem um rápido influxo iônico através da membrana (principalmente de íons cálcio), a ativação de uma cascata de sinalização por MAP quinases e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes eventos moleculares modulam a expressão de genes de defesa e vias metabólicas hormonais (principalmente ácido salicílico e etileno) envolvidos, por exemplo, com a fortificação de paredes celulares e síntese de compostos antimicrobianos para conter o avanço microbiano nos tecidos (BOLLER & FELIX, 2009; ZIPFEL & ROBATZEK, 2010).

O sucesso da infecção pelo patógeno vai depender, neste momento, da habilidade deste em suprimir as respostas PTI da planta, o que pode ser alcançado, na maioria das vezes, a partir da secreção de moléculas conhecidas como efetoras ou indutoras (JONES & DANGL, 2006). Embora parte dessas proteínas efetoras apresente ação apoplástica, algumas bactérias adaptadas são também capazes de “injetar” moléculas efetoras diretamente no citoplasma das células de hospedeiros. A introdução dessas moléculas efetoras no interior das células se dá principalmente a partir do “maquinário” presente no sistema de secreção do Tipo III (TANG et al., 2006; BUTTNER & HE, 2009). As inúmeras moléculas efetoras produzidas pelos patógenos são capazes de atuar em diferentes componentes do sistema de reconhecimento e sinalização nas células dos hospedeiros. A ação desses efetores leva à supressão parcial ou total das respostas de defesa PTI e desencadeiam a susceptibilidade no hospedeiro (ETS, de *Effector-triggered susceptibility*). A dinâmica co-evolução da interação planta-patógenos, por sua vez, fez surgir nas células de plantas hospedeiras adaptadas a proteínas-R de resistência capazes de reconhecer (pela presença ou atividade) os efetores produzidos pelos patógenos. Em plantas, a maioria destas proteínas R são receptores intracelulares citoplasmáticos pertencentes à família dos NBS-LRR (*Nucleotide Binding site-Leucine-Rich Repeat*) que reconhecem com grande especificidade as moléculas efetoras e desencadeiam

respostas de defesa do tipo ETI (*Effector-Triggered Immunity*). As respostas de defesa ETI representam a segunda linha de defesa induzida do sistema de imunidade inata das plantas e o reconhecimento está associado a especificidade da molécula efetora sintetizada por determinada linhagem do patógeno (*gene to gene*). Nas respostas ETI, há normalmente o desencadeamento de respostas de hipersensibilidade (HR) e de resistência sistêmica adquirida (SAR) por parte do hospedeiro podendo levar à morte celular programada para conter o avanço microbiano nos tecidos (JONES & DANGL, 2006; THOMMA et al., 2011).

Com a detecção dos patógenos, as plantas podem ativar diversos mecanismos de defesa para matar, expulsar ou conter o avanço dos microrganismos nos tecidos. O fechamento estomático é uma resposta comum e permite limitar a entrada dos patógenos nas células. As plantas também produzem compostos antimicrobianos, como fitoalexinas, e restringem a transferência de nutrientes do citossol para o apoplasto para limitar a multiplicação bacteriana. Outras respostas comuns incluem o depósito de calose para reforçar as paredes celulares, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) para sinalização ou pelos efeitos tóxicos contra os microrganismos, a morte celular programada, dentre outras (MELOTTO et al., 2008; WANG et al., 2012, 'O BRIEN et al., 2012; BIGEARD et al., 2015).

As respostas de imunidade inata PTI e ETI são de grande importância no estabelecimento de tolerância e/ou resistência das plantas e o desencadeamento destas respostas depende primariamente do reconhecimento dos patógenos invasores por receptores de membrana (PRRs) ou citoplasmáticos (proteínas R).

1.5. Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases: LRR-RLKs

Em nível celular, as informações são recebidas e processadas através de diferentes classes de receptores ancorados na superfície das membranas. As plantas, por serem organismos sésseis, tiveram que desenvolver um grande número de receptores durante a evolução para se adaptarem às diferentes condições do meio. Os receptores são fundamentais não só para plantas, mas para todos os seres vivos que precisam interagir com o ambiente. Os receptores permitem o reconhecimento de diferentes sinais extracelulares e a comunicação entre as células, que são processos essenciais na regulação de respostas, sejam elas de defesa ou relacionadas a crescimento e desenvolvimento (OSAKABE et al., 2013).

A classe de receptores *Receptor-like kinase* (RLK) constitui uma família grande de proteínas transmembranas que apresenta papel importante em inúmeros processos biológicos. As RLKs tipicamente apresentam, além de um domínio transmembrana para se ancorarem na superfície das células, um domínio extracelular amino-terminal (N-terminal) variável e um domínio intracelular típico de quinase na região C-terminal. A presença de domínios variáveis na região extracelular N-terminal contribui para que estas proteínas atuem como sinalizadores em um grande número de vias metabólicas. As RLKs estão envolvidas com a regulação de processos distintos, como o controle de crescimento, desenvolvimento, diferenciação, morfogênese, morte celular e respostas de defesa contra patógenos. Pelo menos 21 classes de domínios diferentes foram identificadas na região extracelular N-terminal das RLKs e, além de definir a especificidade com os ligantes, estes domínios são também utilizados para classificar as subfamílias de RLKs (GREEF et al, 2012). A subfamília de RLKs que apresenta na região extracelular domínio com repetições ricas em leucina (LRR-RLKs) representa o maior e mais bem estudado grupo entre as RLKs, com mais de 200 representantes identificados no genoma de *A. thaliana* e mais de 300 em arroz (SHIU & BLEECKER, 2001; SHIU et al., 2004).

Além de desempenharem papéis importantes em vários processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento, as LRR-RLK também estão envolvidas com a regulação de respostas de defesa contra diversos tipos de estresses, incluindo o ataque de pragas e patógenos. O receptor Xa21 constitui um exemplo bem estudado de LRR-RLK capaz de atuar como PRR. Em plantas selvagens de arroz, Xa21 está envolvido com o reconhecimento de proteína sulfatadas tipo-1 (Ax21) e é capaz de conferir resistência a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, agente causador da ferrugem bacteriana em cultivares de arroz (*Oryza sativa*) (SONG et al., 1995; PARK, 2010; ZHANG & WANG 2008). Os receptores FLS2 e EFR, por sua vez, representam receptores LRR-RLK capazes de reconhecer como PAMPs/MAMPs as proteínas bacterianas flagelina e EF-Tu, respectivamente e da mesma forma desencadeiam as respostas de defesa do tipo PTI (GOMEZ-GOMEZ & BOLLER, 2000; ZIPFEL et al., 2006).

Foco deste estudo, o receptor EFR (*Elongation Factor-Tu Receptor*) pertencente à família *Brassicaceae* é capaz de reconhecer sequências conservadas (epítipo elf18) na proteína EF-Tu de diversos gêneros de bactérias patogênicas,

incluindo *Xylella*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Dickeya*, *Escherichia*, *Ralstonia* e *Pseudomonas* (KUNZE et al, 2004, LACOMBE et al., 2010). O EFR aparentemente evoluiu apenas em membros da família *Brassicaceae*. Entretanto, foi demonstrado que sua transferência para outras espécies de plantas permite conferir resistência a bactérias que normalmente são patogênicas nestes hospedeiros (LACOMBE et al., 2010). Assim, o sistema de percepção mediado por EFR pode ser transferido para plantas cultivadas suscetíveis ao ataque de bactérias que apresentem EF-Tu capaz de ser reconhecido como PAMP, como pode ser o caso da *X. fastidiosa*. Dessa forma, a resistência a estas pode ser “incorporada” pela ativação mais eficiente e mais rápida principalmente da resposta de imunidade do tipo PTI.

Análises filogenéticas dos membros de LRR-RLK podem também ajudar a responder questões importantes acerca da evolução destes receptores entre as plantas de citros. A disponibilidade de bancos com genoma completamente sequenciado de espécies de citros resistente (*C. clementina*) e susceptível (*C. sinensis*) a infecção por *X. fastidiosa* permite o desenvolvimento de interessantes trabalhos de análises comparativas, por exemplo utilizando filogenia molecular para compreender melhor a organização e evolução das LRR-RLKs entre essas espécies que são importantes comercialmente. Esse tipo de estudo foi explorado em genomas de plantas-modelo como *Arabidopsis*, arroz, tomate ou *Populus* (SHIU & BLEECKER, 2001; SHIU et al., 2004, SUN & WANG, 2011; SAKAMOTO et al., 2012; ZAN et al., 2013). Entretanto, uma abrangente análise filogenética evolutiva das LRR-RLKs ainda não foi realizada para espécies de *Citrus*, apesar da recente disponibilidade de genomas completos sequenciados e principalmente considerando o grande número de fitopatógenos que prejudica o cultivo de citros nos principais países produtores.

1.6. Plantas-Modelo em Estudos de Genômica Funcional

A utilização de plantas-modelo tornou-se muito frequente entre os estudos de genômica funcional, permitindo de forma rápida a obtenção de um grande número de informações genéticas e moleculares e que são importantes para o entendimento do comportamento de genes entre espécies mais complexas.

Enquanto milho (*Zea mays*) e arroz (*Oryza sativa*) constituem exemplos de plantas-modelo geralmente utilizadas entre espécies de monocotiledôneas, *Arabidopsis thaliana* representa o principal exemplo entre as espécies dicotiledôneas (ISAWA & SHIMAMOTO, 1996; MEINKE et al., 1998).

A. thaliana constitui uma espécie de eudicotiledônea pertencente à família *Brassicaceae* (antiga *Cruciferae*), a mesma das mostardas, e apesar da pequena importância agrícola, possui elevada importância como planta-modelo em estudos funcionais por apresentar características de interesse, como genoma pequeno e totalmente sequenciado, ciclo de vida curto, pequeno porte, protocolo simples de transformação, grande produção de sementes e ainda um grande número de mutantes disponíveis (<http://signal.salk.edu/>) (KOORNNEEF & MEINKE, 2010).

Além de *A. thaliana*, o tabaco (*Nicotiana tabacum*) representa uma dicotiledônea bastante utilizada como planta-modelo pois também apresenta inúmeras características que facilitam por exemplo estudos funcionais, como curto ciclo de vida, produção de grandes quantidades de sementes, além da facilidade no cultivo e transformação genética (GANAPATHI et al., 2004; BRASILEIRO, 1998).

Considerando as dificuldades para obtenção de plantas transgênicas em diversas espécies de plantas mais complexas, como as espécies de citros que apresentam baixa eficiência de transformação, longo ciclo de vida e período de juvenilidade, o uso de espécies de plantas-modelo representa uma estratégia importante para o estudo funcional de genes de interesse.

2. JUSTIFICATIVA

A partir do que foi exposto, fica evidente que a citricultura nacional, apesar da destacada importância social e econômica, apresenta elevadas perdas devido ao grande número de patógenos que causam doenças de grande impacto econômico, como por exemplo, a CVC causada pela *Xylella fastidiosa*. A obtenção de plantas que apresentem resistência duradoura e de amplo espectro contra doenças causadas por microrganismos representa um importante foco nas pesquisas científicas. Nesse contexto, enquanto as técnicas de melhoramento tradicional geralmente requerem um longo tempo e principalmente apresentam a

desvantagem de introduzir genes com características não desejáveis, a engenharia genética surge como uma interessante alternativa que permite a transferência de características individuais de modo mais preciso e, além disso, possibilitam ainda a capacidade de introduzir características de interesse inclusive de outras espécies, o que é impossível em programas de melhoramento clássico.

Nos últimos anos, os estudos com genoma e genética funcional de plantas e interações com patógenos aumentaram consideravelmente a compreensão acerca das bases moleculares associadas com o processo de infecção e imunidade das plantas, fornecendo a oportunidade de selecionar novos alvos a serem utilizados em resistência duradoura e de amplo espectro. Os receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) representam interessantes alvos a serem explorados devido ao papel crucial que desempenham no desencadeamento de respostas de imunidade inata, e que por sua vez, representam as bases para resistência contra amplo espectro de patógenos.

Alguns PRRs aparentemente evoluíram apenas em classes específicas de plantas, como é o caso do EFR que parece ser específico de indivíduos pertencentes à classe Brassicaceae. Sua transferência, a partir de ferramentas de engenharia genética, para espécies de plantas de outras famílias de plantas pode significar uma estratégia promissora visando resistência a um maior número de patógenos. Embora a importância dos PRRs na imunidade das plantas já tenha sido demonstrada, trata-se de uma alternativa ainda muito pouco explorada entre as espécies de plantas cultivadas. Neste trabalho, considera-se que a suscetibilidade observada entre as espécies de laranja doce a *X. fastidiosa* pode estar relacionada com ausência ou ineficiência de receptores de membrana específicos para o reconhecimento de PAMPs. Assim, os estudos que possibilitem uma maior eficácia no reconhecimento de *X. fastidiosa* por meio da superexpressão de PRRs são de interesse neste trabalho.

A bactéria *X. fastidiosa* apresenta em seu genoma duas cópias do gene que codifica EF-Tu, e recentemente foi verificado que, além de ser secretada, a proteína EF-Tu codificada pela cópia XF2628 é altamente expressa em condições de biofilme maduro (SILVA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2016). Sabendo-se que a condição de biofilme é a forma de crescimento da *X. fastidiosa* na planta, abre-se uma real possibilidade de EFR reconhecer *X. fastidiosa* e ativar o sistema de resistência mediada por PTI, visto que *in vitro* o epítipo elf18 desta bactéria foi

capaz de desencadear atividade elicitora em *A. thaliana* quando em altas concentrações (KUNZE et al., 2004).

Como mencionado acima, apesar do elevado interesse comercial, da disponibilidade de genomas completos sequenciados e da importância destacada dos receptores LRR-RLK na defesa contra patógenos, nenhuma análise evolutiva envolvendo os membros dessa família de genes foi feita para as espécies de *Citrus*. A compreensão da evolução dessa família gênica nos genomas de *C. clementina* e *C. sinensis*, espécies similares quanto a ancestralidade e composição do genoma, mas distintas por exemplo quanto a suscetibilidade a doenças como CVC, pode revelar informações importantes acerca das respostas de defesa e da evolução das LRR-RLKs em *Citrus*.

Dessa forma, essa Tese de doutorado foi desenvolvida com intuito principal de preencher essa lacuna no conhecimento científico, ou seja, aumentando a compreensão da evolução e organização estrutural das LRR-RLKs nos genomas de *Citrus* e também avaliando o papel do receptor de EF-Tu no reconhecimento de *X. fastidiosa*. O **Capítulo 1** aborda as análises *in silico* para identificação e classificação filogenética dos membros da família LRR-RLK em *C. clementina* e *C. sinensis*. O **Capítulo 2, por sua vez**, apresenta os estudos funcionais envolvendo o receptor EFR no possível reconhecimento de EF-Tu de *X. fastidiosa* e desencadeamento de resposta de imunidade inata PTI utilizando *Arabidopsis* e Tabaco como plantas-modelos.

3. REFERÊNCIAS

ASAI, S.; SHIRASU, K. Plant cells under siege: plant immune system versus pathogen effectors. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 28, p.1-8, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2015.08.008>.

BACCARI, C.; LINDOW, S.E. Assessment of the Process of Movement of *Xylella fastidiosa* Within Susceptible and Resistant Grape Cultivars. **Phytopathology**, v. 101, n. 1, p.77-84, jan. 2011. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-04-10-0104>.

BARRETT, H.C.; RHODES, A.M. A Numerical Taxonomic Study of Affinity Relationships in Cultivated Citrus and Its Close Relatives. **Systematic Botany**, v. 1, n. 2, p.105-118, 1976. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2418763>.

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling Mechanisms in Pattern-Triggered Immunity (PTI). **Molecular Plant**, v. 8, n. 4, p.521-539, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.022>.

BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review Of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p.379-406, jun. 2009. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>.

BOVÉ, J.M.; AYRES, A.J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: Sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. **Iubmb Life**, v. 59, n. 4, p.346-354, 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1080/15216540701299326>.

BRASILEIRO, A.C.M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A C. M.; CARNEIRO, V. T. de C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA- CENARGEN, p.309, 1998.

BUTTNER, D.; HE, S.Y. Type III Protein Secretion in Plant Pathogenic Bacteria. **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p.1656-1664, 2009. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.139089>.

CASERTA, R. et al. Expression of *Xylella fastidiosa* Fimbria and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.4250-4259, 2010.

CHAPOT, H. **The citrus plant**. In: HÄFLIGER, E. (ed.). Citrus: Basle, Switzerland, CIBA-GEIGY Ltd., p. 14-20, 1975.

CHATTERJEE, S.; ALMEIDA, R.P.P; LINDOW S. Living in two Worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. **Annual Review of Phytopathology**, v.46, p.243-271, 2008.

De NEGRI, J.D. **Clorose variegada dos Citros: uma nova anomalia afetando pomares em S. Paulo e Minas Gerais**. Comunicado Técnico nº 82. Extensão Rural, Coord. Ass. Téc. Integral (CATI), Campinas, 6p, 1990.

FAN, J.; DOERNER, P. Genetic and molecular basis of nonhost disease resistance: complex, yes; silver bullet, no. **Opinion In Plant Biology**, v. 15, n. 4, p.400-406, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2012.03.001>.

GANAPATHI, T.R. et al. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, p.171-184, 2004.

GARCIA-LOR, A. et al. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the 'true citrus fruit trees' group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. **Annals of Botany**, v. 111, n. 1, p.1-19, 26 out. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcs227>.

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2. **Molecular Cell**, v. 5, n. 6, p.1003-1011, jun. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80265-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80265-8).

GREEFF, C. et al. Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. **Frontiers In Plant Science**, v. 3, p.1-9, 2012. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00209>.

GUO, W.W.; DENG, X.X. Wide somatic hybrids of Citrus with its related genera and their potential in genetic improvement. **Euphytica**, v. 118, n. 2, p.175-183, 2001. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1004147208099>.

HANDA, T.; ISHIZAWA, Y.; OOGAKI, C. Phylogenetic study of Fraction I protein in the genus Citrus and its close related genera. **The Japanese Journal Of Genetics**, v. 61, n. 1, p.15-24, 1986. Genetics Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1266/jjg.61.15>.

IZAWA, T.; SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: The importance of rice to plant science. **Trends In Plant Science**, v. 1, n. 3, p.95-99, mar. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1360-1385\(96\)80041-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1360-1385(96)80041-0).

JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p.323-329, 2006. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05286>.

KLAUSER, D. et al. The Arabidopsis Pep-PEPR system is induced by herbivore feeding and contributes to JA-mediated plant defence against herbivory. **Exbotj**, v. 66, n. 17, p.5327-5336, 1 jun. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erv250>.

KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. The development of Arabidopsis as a model plant. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p.909-921, mar. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313x.2009.04086.x>.

KUNZE, G. et al. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. **Plant Cell**, v.16, p.3496-3507, 2004.

LACOMBE, S. et al. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 4, p.365-369, 14 mar. 2010. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1613>.

LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE-JUNIOR, R.P.; CEREZINE, P.C. Flutuação populacional de *Xylella fastidiosa* em ameixeiras suscetíveis e resistentes à escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.58-63, 1997.

LI, Y. et al. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation, and cell-cell aggregation. **Microbiology**, v.53, p.719-726, 2007.

LUCAS, J.A. Plant Pathology and Plant Pathogens. 3rd ed.; Blackwell, **Science**, 1998.

MACHADO, M.A.; CRISTOFANI-YALY, M.; BASTIANEL, M. Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 33, n. 1, p.158-172, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452011000500019>.

MACKEY, D.; MCFALL, A.J. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 6, p.1365-1371, set. 2006. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05311.x>.

MANDALARI, G. et al. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p.2056-2064, 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x>.

MARQUES, J.P.R. et al. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.1531-1536, 2007.

MAZZOTTA, S.; KEMMERLING, B. Pattern recognition in plant innate immunity. **J Plant Pathol**, v. 93, p.7-17, 2011.

MEDZHITOV, R.; A JANEWAY, C. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. **Cell**, v. 91, n. 3, p.295-298, out. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80412-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80412-2).

MEINKE, D.W. et al. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. **Science**, v. 282, n. 5389, p.662-682, 23 out. 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5389.662>.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; HE, S.Y. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 46, n. 1, p.101-122, set. 2008. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>.

MOORE, G.A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. **Trends In Genetics**, v. 17, n. 9, p.536-540, set. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02442-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02442-8).

MOREIRA, C.S.; PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JÚNIOR, J.; AMARO, A. S. **Citricultura brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 1991. p. 116-152.

NAVARRA, M. et al. *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. **Frontiers In Pharmacology**, v. 6, p.1-36, 2 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00036>.

NEVES, M.F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**, São Paulo: CitrusBR, p.138, 2011.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 5, n. 4, p.318-324, ago. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00265-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00265-0).

O'BRIEN, J.A. et al. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. **Planta**, v. 236, n. 3, p.765-779, 6 jul. 2012. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-012-1696-9>.

OSAKABE, Y. et al. Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. **Journal Of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p.445-458, 1 jan. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers354>.

PARK, C.J. et al. Elucidation of XA21-mediated innate immunity. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 8, p.1017-1025, 25 jun. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01489.x>.

PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** V. 34, p.131–151, 1996.

ROPER, M.C. et al. Detection and Visualization of an Exopolysaccharide Produced by *Xylella fastidiosa* In Vitro and In Planta. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p.7252-7258, 7 set. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00895-07>.

SAKAMOTO, T. et al. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRRII-RLK subfamily in antiviral defense. **Bmc Plant Biol**, v. 12, n. 1, p.1-18, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-12-229>.

SALOMON, D.; SESSA, G. Biotechnological strategies for engineering plants with durable resistance to fungal and bacterial pathogens. In: **Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century**, n.1, 2012.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p.277-283, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.047>.

SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K.S. Nonhost Resistance Against Bacterial Pathogens: Retrospectives and Prospects. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 51, n. 1, p.407-427, 4 ago. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102319>.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 22, n. 6, p.587-593, 24 jan. 2006. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-9075-3>.

SHIU, S.H. et al. Comparative analysis of the receptor-like Kinase family in *Arabidopsis* and rice. **Plant Cell**, v.16, p.1220-1234, 2004.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 98, n. 19, p.10763-10768, 28 ago. 2001. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.181141598>.

SIMPSON, A.J. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p.151-157, 2000.

SONG, W.Y. et al. A Receptor Kinase-Like Protein Encoded by the Rice Disease Resistance Gene, Xa21. **Science**, v. 270, n. 5243, p.1804-1806, 15 dez. 1995. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.270.5243.1804>.

SPOEL, S.H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 12, n. 2, p.89-100, 25 jan. 2012. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3141>.

SUN, X.; WANG, G.L. Genome-Wide Identification, Characterization and Phylogenetic Analysis of the Rice LRR-Kinases. **Plos One**, v. 6, n. 3, p.1-12, 8 mar. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016079>.

SWINGLE, W.T. The botany of *Citrus* and its relatives in the orange subfamily. In: WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). **The citrus industry**. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, v.1, p.128-474, 1943.

SWINGLE, W.T.; REECE, P.C. The botany of citrus and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (eds.). The citrus industry. Berkeley and Los Angeles: University of California, v.1, p.190-430, 1967. TANAKA, T. **Species problem in citrus - a critical study of wild and cultivated units of Citrus, based upon field studies in their native homes.** Tokyo: Japanese Society for the Promotion of Science, 1954. 152p.

TALON, M.; GMITTER, F.G. Citrus Genomics. **International Journal Of Plant Genomics**, v. 2008, p.1-17, 2008. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2008/528361>.

TANAKA, T. Fundamental discussion of *Citrus* classification. **Studia in Citrologica**, Osaka, v.14, p.1-6, 1977.

TANG, X.; XIAO, Y.; ZHOU, J.M. Regulation of the Type III Secretion System in Phytopathogenic Bacteria. **Mpmi**, v. 19, n. 11, p.1159-1166, nov. 2006. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-19-1159>.

THOMMA, B.P.; NURNBERGER, T.; JOOSTEN, M.H. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI- ETI dichotomy. **Plant Cell**, v. 23, p.4-15, 2011.

UMA, B.; RANI, T. S.; PODILE, A.R. Warriors at the gate that never sleep: Non-host resistance in plants. **Journal Of Plant Physiology**, v. 168, n. 18, p.2141-2152, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2011.09.005>.

VELASCO, R.; LICCIARDELLO, C. A genealogy of the citrus family. **Nat Biotechnol**, v. 32, n. 7, p.640-642, 8 jul. 2014. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2954>.

VERZERA, A. et al. Effects of Rootstock on the Composition of Bergamot (*Citrus bergamia* Risso et Poiteau) Essential Oil. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 1, p.206-210, jan. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf0206872>

WANG, K. et al. Phytosterols Play a Key Role in Plant Innate Immunity against Bacterial Pathogens by Regulating Nutrient Efflux into the Apoplast. **Plant Physiology**, v. 158, n. 4, p.1789-1802, 31 jan. 2012. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.189217>.

YAMAGUCHI, Y.; HUFFAKER, A. Endogenous peptide elicitors in higher plants. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 14, n. 4, p.351-357, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.05.001>.

ZAN, Y. et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of populus leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p.318-36, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-318>.

ZHANG, H.; WANG, S. Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: a unique pathosystem. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 16, n. 2, p.188-195, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.008>.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S. PAMP-triggered immunity: veni, vidi, ...? **Plant Physiology**, 154 (2): 551-554, 2010.

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

ZIPFEL, C. et al. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. **Cell**, v. 125, n. 4, p.749-760, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.037>.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 12, n. 4, p.414-420, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003>.

ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends In Immunology**, v. 35, n. 7, p.345-351, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>.

ZULIAN, A.; DÖRR, A.C.; ALMEIDA, S.C. Citricultura and cooperative agribusiness in Brazil. **Reget**, v. 11, n. 11, p.2291-2306, 3 jun. 2013. Universidade Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/223611708700>.

CAPITULO 1 - ANÁLISE FILOGENÉTICA DE LRR-RLKs EM CITRUS

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e classificar LRR-RLKs nos genomas de *Citrus clementina* e *Citrus sinensis* através de reconstrução de árvores filogenéticas.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recuperar as sequências de LRR-RLK presentes nos bancos de proteínas preditas de *C. clementina* e *C. sinensis*.
- Identificar os domínios entre as sequências de LRR-RLK de *C. clementina* e *C. sinensis*.
- Alinhar as sequências de LRR-RLK de *C. clementina* e *C. sinensis* a partir do domínio quinase.
- Gerar árvores filogenéticas com sequências de aminoácidos de LRR-RLK de *A. thaliana*, *C. clementina* e *C. sinensis*.
- Identificar e classificar os grupos de LRR-RLK de *C. clementina* e *C. sinensis*.
- Analisar a distribuição de LRR-XII nos cromossomos de *C. clementina* e *C. sinensis*.
- Gerar árvore filogenética com sequências de proteínas LRR-XII de *A. thaliana*, *C. clementina* e *C. sinensis*.
- Identificar clusters e blocos de duplicação entre as LRR-XII nos genomas de *C. clementina* e *C. sinensis*.
- Identificar pares de ortólogos e analisar relações de sintonia entre as LRR-XII de *C. clementina* e *C. sinensis*.

ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BMC GENOMICS

BMC Genomics (2016) 17:623

DOI: 10.1186/s12864-016-2930-9

LRR-RLK family from two *Citrus* species: Genome-wide identification and evolutionary aspects

Diogo M. Magalhães^{1,2}, Larissa L. Silva Scholte³, Nicholas V. Silva¹, Guilherme C. Oliveira^{3,4}, Cyril Zipfel⁵, Marco A. Takita¹, Alessandra A. Souza¹

1- Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Instituto Agronômico, Cordeirópolis, São Paulo, Brazil

2- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

3- Grupo de Genômica e Biologia Computacional, Centro de Pesquisas René Rachou, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

4- Instituto Tecnológico Vale – ITV, Belém, Pará, Brazil

5- The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich, NR4 7UH, UK.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



LRR-RLK family from two *Citrus* species: genome-wide identification and evolutionary aspects

Diogo M. Magalhães^{1,2}, Larissa L. S. Scholte³, Nicholas V. Silva¹, Guilherme C. Oliveira^{3,4}, Cyril Zipfel⁵, Marco A. Takita¹ and Alessandra A. De Souza^{1*}

Abstract

Background: Leucine-rich repeat receptor-like kinases (LRR-RLKs) represent the largest subfamily of plant RLKs. The functions of most LRR-RLKs have remained undiscovered, and a few that have been experimentally characterized have been shown to have important roles in growth and development as well as in defense responses. Although RLK subfamilies have been previously studied in many plants, no comprehensive study has been performed on this gene family in *Citrus* species, which have high economic importance and are frequent targets for emerging pathogens. In this study, we performed *in silico* analysis to identify and classify LRR-RLK homologues in the predicted proteomes of *Citrus clementina* (clementine) and *Citrus sinensis* (sweet orange). In addition, we used large-scale phylogenetic approaches to elucidate the evolutionary relationships of the LRR-RLKs and further narrowed the analysis to the LRR-XII group, which contains several previously described cell surface immune receptors.

Results: We built integrative protein signature databases for *Citrus clementina* and *Citrus sinensis* using all predicted protein sequences obtained from whole genomes. A total of 300 and 297 proteins were identified as LRR-RLKs in *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively. Maximum-likelihood phylogenetic trees were estimated using *Arabidopsis* LRR-RLK as a template and they allowed us to classify *Citrus* LRR-RLKs into 16 groups. The LRR-XII group showed a remarkable expansion, containing approximately 150 paralogs encoded in each *Citrus* genome. Phylogenetic analysis also demonstrated the existence of two distinct LRR-XII clades, each one constituted mainly by RD and non-RD kinases. We identified 68 orthologous pairs from the *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-XII genes. In addition, among the paralogs, we identified a subset of 78 and 62 clustered genes probably derived from tandem duplication events in the genomes of *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively.

Conclusions: This work provided the first comprehensive evolutionary analysis of the LRR-RLKs in *Citrus*. A large expansion of LRR-XII in *Citrus* genomes suggests that it might play a key role in adaptive responses in host-pathogen co-evolution, related to the perennial life cycle and domestication of the citrus crop species.

Keywords: *Citrus sinensis*, *Citrus clementina*, Leucine-rich repeat receptor-like kinase, Phylogeny

Background

Signaling through cell surface receptors is essential for cells to communicate and interact with the environment. Plant cells are able to perceive and transduce a wide range of signals mainly through receptor-like kinases (RLKs), which mediate cell-to-cell communication by

binding to extracellular ligands or forming heteromeric complexes to mediate intracellular signaling [1]. These modular kinase receptors belong to a large monophyletic gene family with more than 400 members identified in *Arabidopsis* [2]. RLKs are typically transmembrane (TM) proteins with a variable amino-terminal extracellular domain (ECD) and a conserved cytoplasmic serine/threonine kinase domain (KD) in the carboxyl-terminal region [3]. The ECD regions play important roles in the recognition of internal signals or environmental stimuli

* Correspondence: alessandra@centrodecitricultura.br

¹Instituto Agronômico, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



and, according to their features, can be used to classify RLKs [4]. More than 21 structural classes were classified in *Arabidopsis* RLKs based on their ECDs, with the largest one containing leucine-rich repeats (LRRs) [2]. Phylogenetic-based analysis of the *Arabidopsis* RLKs using the KDs and structural comparison of their ECDs allowed the identification of more than 40 subfamilies [2].

In plants, LRR-RLK proteins constitute a diverse group of transmembrane receptors involved in many biological functions usually associated with growth and development [5–9] and responses to biotic and abiotic stresses [10–13]. More than 200 LRR-RLK genes have been identified in the fully sequenced *Arabidopsis* genome [14–16]. Concerning plant-microbe interactions, certain LRR-RLKs play essential roles in defense responses to pathogen attacks by recognizing conserved pathogen- or microbe-associated molecular patterns (PAMPs/MAMPs) such as flagellin and elongation factor thermo unstable (EF-Tu) [17, 18]. LRR-containing proteins are suitable for pathogen recognition because their structural plasticity allows them to bind to many distinct ligands, such as proteins, peptides or lipids [19]. Receptor proteins that are able to recognize PAMPs/MAMPs are designated pattern-recognition receptors (PRRs) [17] and represent an essential step for the host to perceive and defend itself against pathogens by triggering innate immune responses. Many PRRs belong to the LRR-RLK subfamily [18, 20]. The *Arabidopsis* FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) [21], EF-TU RECEPTOR (EFR) [22] and rice XA21 [23] are among the best-studied plant PRRs and can activate immunity responses by perceiving specific bacterial proteins (or derived peptidic epitopes). These well-characterized PRRs belong to the XII group of LRR-RLKs (LRR-XII), suggesting an important role in mediating immunity responses during plant-microbe interactions.

Citrus comprise some of the most economically important crops in the world, and the species of this group produce fruits with great commercial value, such as oranges, mandarins, lemons, grapefruits and pummelos. While *Citrus clementina* represents one of the major species of mandarins, consumed as fresh fruit [24], sweet orange (*C. sinensis*) has the largest commercial importance, mainly due to the orange juice market [25]. The genomes of these species were recently sequenced and even though the identity and contribution of ancestors in the composition of the domesticated citrus genome was unclear, it is suggested that these crops are hybrids derived mainly from *C. maxima* and *C. reticulata* [26, 27]. *Citrus* species are mostly diploid and display a basic chromosome number of $x = 9$. Substantial segmental synteny is observed with other eudicots and an orthology relation of one to one

across oranges and plants such as grape, strawberry and cacao suggests the inexistence of recent whole genome duplication (WGD), with the exception of a triplication genome shared by all eudicots [26]. *Citrus* is part of the Sapindales order, a sister order of Brassicales into the Malvaceae family, which allows the performance of studies involving genomic comparisons with *Arabidopsis thaliana* [26].

The main problem that affects the citrus culture worldwide is the huge amount of phytopathogens [24], which cause significant damage to the citrus agribusiness. Apomictic reproduction, high juvenility and a long cultivation period are characteristics that contribute to a narrow genetic diversity in citrus crops, which increases the probability of the appearance of diseases and makes it difficult for breeding programs to obtain materials with increased resistance to pathogens [27]. Although there is narrow genetic diversity, there are different levels of resistance among *Citrus* species for different diseases, such as the Citrus canker [27–29], Alternaria brown spot [30], Huanglongbing [31] and Citrus variegated chlorosis (CVC) [32, 33]. *Xylella fastidiosa*, for instance, causes CVC in all commercial sweet orange varieties, but not in *C. clementina*, despite both species being derived from the same ancestors [34]. The comparison of defense gene families among plants with different levels of resistance is a strategy for better understanding the host defense in plant-pathogen interactions. Considering the recent sequencing of the complete genomes of *C. clementina* and *C. sinensis* and the involvement of LRR-RLKs in defense responses, we performed *in silico* analyses to elucidate and compare the structural organization of LRR-RLK members from the *Citrus* databases. The LRR-RLK subfamily has been characterized in plants such as *Arabidopsis*, rice, *Populus*, tomato, and others [35–39], but no comprehensive study was performed for *Citrus* species.

Results and discussion

Identification of *Citrus* LRR-RLKs

To identify the LRR-RLK subfamily members encoded by *C. sinensis* and *C. clementina* genomes, we used a combined computational approach. The predicted proteomes of each *Citrus* species and *A. thaliana* were used as inputs (Table 1) to build signature databases with the *InterProScan* tool. The resulting data were then uploaded into relational databases.

A search for protein sequences with both kinase and transmembrane signatures was initially performed for the identification of surface RLK family homologs. The catalytic KD was detected in 1,169, 1,208, and 1,034 non-redundant protein sequences from *C. clementina*, *C. sinensis* and *A. thaliana*, respectively. Plant protein kinases are one of the largest existing gene families and

Table 1 Genome data of *C. clementina*, *C. sinensis*, and *A. thaliana*

	Plant species		
	<i>Citrus clementina</i>	<i>Citrus sinensis</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Database version	clementina 1.0 (version 1.0)	CsiDB 2013 (version 2.0)	TAIR 10 release
Estimated genome size	301.4 Mb	367 Mb	129 Mb
Protein-coding loci	24,533 sequences	29,445 sequences	27,416 sequences
Alternative transcripts	9,396 sequences	14,982 sequences	4,693 sequences
Total transcripts	33,929 sequences	44,427 sequences	32,109 sequences
Available on	https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html	http://citrus.hzau.edu.cn/orange/	http://arabidopsis.org/

represent approximately 4 % of all coding genes in *A. thaliana* [40]; a similar number was found for *C. clementina* (4.9 %) and *C. sinensis* (4.0 %). These percentages of genes encoding kinase proteins are close to what was found in poplar and rice [41]. Among these protein sequences, 617, 626 and 466 members of *C. clementina*, *C. sinensis* and *A. thaliana*, respectively, contained the KD and TM helices (Table 2). In the present study, we did not work with alternative splicing variants, and we considered only the membrane surface RLKs in our analysis, which did not include the receptor-like cytoplasmic kinases (RLCKs) because they do not have TM domains [38, 42]. For *A. thaliana*, approximately 620 RLK members have been reported to be present in the genome, including almost 150 RLCKs [4]. Thus, the number of cell surface RLKs identified for Arabidopsis in this work (466) is consistent with previous reports [16]. Cell surface RLKs displaying LRR-type ECDs were considered putative LRR-RLK subfamily members. LRR-RLKs belong to a large subfamily for which we identified 300, 297 and 236 protein sequences in the *C. clementina*, *C. sinensis* and *A. thaliana* genomes, respectively, which represents approximately 50 % of the total surface RLKs in each genome. We also removed the *A. thaliana* sequences that were the products of alternative splicing, as previously performed for *C. clementina* and *C. sinensis*. The result was compared to an *A. thaliana* LRR-RLK dataset [14, 15] to improve accuracy. Thus, from the 236 *A. thaliana* protein sequences, we considered a final dataset containing 209 LRR-RLK sequences for further analysis (Table 2; Additional file 1). The KDs from LRR-

RLKs of *C. clementina*, *C. sinensis* and *A. thaliana* were identified by searching for diagnostic domains according to the functional annotation in the Pfam database (Pkinase_Tyr PF07714 and Pkinase PF00069). As reported by Shiu et al. [38], some proteins exhibited more than one catalytic KD. In these cases, we further analyzed the catalytic domains to determine whether the truncated regions should be manually merged or kept as different KDs. After another round of filtering, such as removing gap-rich regions and excluding redundant sequences, the final dataset used for the evolutionary analyses contained a total of 302 and 304 KDs from *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively, in addition to the 209 KDs from the *A. thaliana* LRR-RLKs (Table 2; Additional file 2).

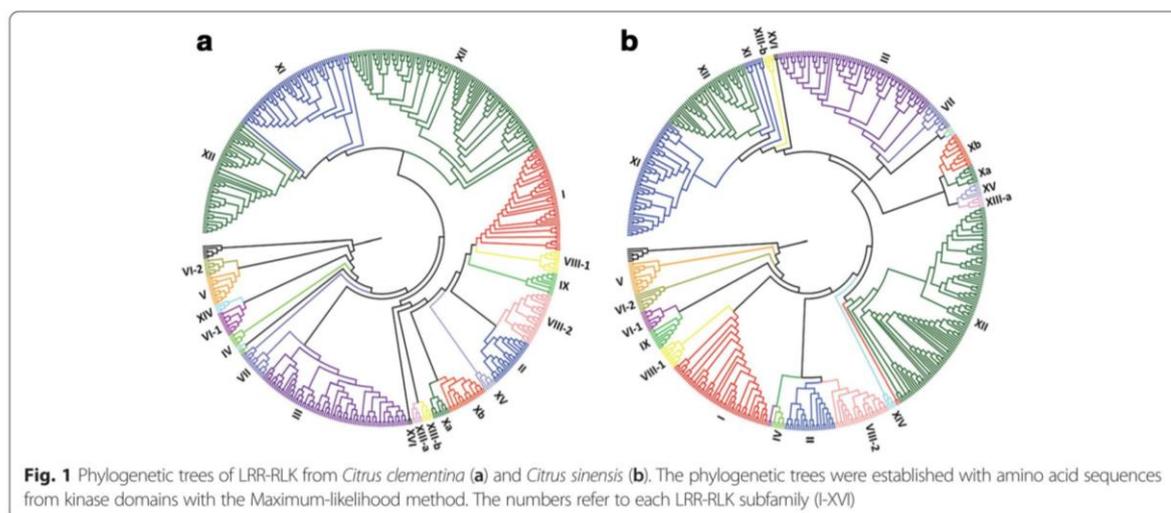
Evolutionary analyses and structural organization of LRR-RLKs

An identification and classification of LRR-RLK from *C. clementina* and *C. sinensis* was previously done using genome assemblies obtained from the outdated Phytozome v.7 [41]. In this work we used currently accepted genome assemblies to identify, classify and perform a comprehensive genomic study for the LRR-RLK subfamily groups in the *C. clementina* and *C. sinensis*. The KD sequences from each *Citrus* dataset were independently aligned with the KDs from all *A. thaliana* LRR-RLK subfamily members. Maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees allowed us to estimate the evolutionary relationships among the sequences (Fig. 1). The *Citrus* sequences that clustered together with known members of *A. thaliana* LRR-RLK were defined as part of the correspondent group. The majority of clades in each phylogeny was well-supported with confidence statistical values above 0.70 (Additional files 3 and 4), demonstrating the reliability of the generated data (Fig. 1). The robustness of our analysis was confirmed by generating another phylogenetic tree using the LRR-RLKs from both *Citrus* species together in the same tree (Additional file 5). Of 606 KDs, 601 (>99 %) were grouped in well-supported clades, as

Table 2 Protein classification according to the presence of diagnostic domains in *C. clementina*, *C. sinensis*, and *A. thaliana* proteomes

Predicted proteins	Plant species		
	<i>C. clementina</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>A. thaliana</i>
Kinases	1,208	1,169	1,034
TM kinases	617	629	466
TM kinases with LRR (KD) ^a	300 (302)	297 (304)	209 (209)

^aThe numbers in parenthesis represent the total number of kinase domains identified in the TM kinases with LRR



observed in the individual analysis of the *C. clementina* and *C. sinensis* datasets (Fig. 1), reinforcing the hypothesis that these sequences were evolutionarily related.

The topology of ML phylogenetic trees allowed us to distinguish, in the *C. clementina* and *C. sinensis* genomes, the same 16 groups of LRR-RLKs (I to XVI) previously described for *A. thaliana* [14] that were used for *Citrus* classification (Table 3; Additional file 6). Additionally, group XII, which was the focus of our work, presents the characteristic division in two sub-groups (Fig. 1; Additional file 5) as also reported for other plant species [15, 37].

In general, the number of LRR-RLK receptors for most of the subfamily groups among the *Citrus* species was similar to *A. thaliana*, except for two of them, i.e., LRR-I and LRR-XII. Regarding LRR-I, 38 members were reported for *A. thaliana*, while in *Citrus*, we identified only 9 and 11 members for *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively. Despite having a smaller genome [43], *A. thaliana* had about four times more RLKs in this group compared to the *Citrus* species. Although *A. thaliana* LRR-I includes receptor proteins associated with defense responses, such as IMPAIRED OOMYCETE SUSCEPTIBILITY 1 (IOS1) [44] and FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1 (FRK1) [45], the majority of members in this group has unknown functions. According to Fischer et al. [39], the last common ancestor of angiosperms (LCAA) probably had only 7 LRR-I in the genome and the expansion rate was related to ancestral expansion rather than species-specific events, suggesting that the high copy number found in *A. thaliana* was due to Brassicaceae expansion and subsequent retention in this species. For *Citrus*,

in contrast, the number of LRR-I remained the same as suggested by LCAA, perhaps because no recent WGD was detected in *Citrus* plants [26].

In relation to LRR-XII, *C. clementina* and *C. sinensis* showed 148 and 140 members, respectively, while in *A.*

Table 3 Total number of receptors distributed in the different groups of LRR-RLKs

Groups	Plant species		
	<i>C. clementina</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>A. thaliana</i>
LRR I	9	11	38
LRR II	10	10	13
LRR III	32	33	41
LRR IV	4	5	4
LRR V	4	5	9
LRR VI-1	6	5	6
LRR VI-2	4	4	4
LRR VII	6	5	8
LRR VIII-1	3	3	7
LRR VIII-2	12	14	12
LRR IX	6	5	4
LRR Xa	4	4	4
LRR Xb	10	8	9
LRR XI	30	33	29
LRR XII	148	140	9
LRR XIII-a	2	2	3
LRR XIII-b	2	2	3
LRR XIV	3	3	3
LRR XV	4	4	2
LRR XVI	1	1	1
Total	300	297	209

thaliana there were only 10 corresponding members. However, one of them (At2g24130) was not included in our analysis because it did not show a predicted transmembrane helix domain in TMHMM v 2.0. If again we compare this with the number of receptors in LCAA LRR-XII (13 genes) [39], it is possible to verify a slight reduction of this group in *Arabidopsis*, while for *Citrus* species, the LRR-XII had a stronger numerical expansion. Interestingly, as observed for *C. clementina* and *C. sinensis*, the LRR-XII group of different plant species also underwent an expansion [38, 39]. The dynamic rates of duplication, retention and loss of genes occurred independently in each subgroup of LRR-RLKs, which resulted in a distinct composition between species, for example, related to LRR-I and XII (Table 4). *A. thaliana* LRR-XII contains two of the most studied PRRs, i.e., FLS2 and EFR, which are involved in the perception of the bacterial PAMPs flagellin and EF-Tu, respectively [21, 22]. In addition to EFR and FLS2, the LRR-RLK XII XA21 from *Oryza longistaminata* is another important well-studied PRR [23], which recognizes the bacterial sulfated protein RaxX [46].

The expansion or reduction in the size of gene families is a result of evolutionary events usually related to duplications, *de novo* creation of genes and deletions [47]. Selective pressure to perceive changing environment signals can drive the expansion of specific RLK subfamily groups that may have important functional effects related to adaptation, for example, to fast-evolving pathogens [14, 41]. It was reported that LRR-XII is a group that keeps expanding and their members are involved in biotic stress responses [39]. In general, we observed that in *Citrus* and other crop species, the number of LRR-XII is increased in relation to LCAA (Table 4), suggesting that domestication may be contributing to the expansion of this group.

Table 4 Total number of LRR-RLKs, LRR-XII and LRR-I found in different plant species

Plant species	LRR-RLK	LRR-XII	LRR-I	Reference
LCAA	150	13	7	[39]
<i>Glycine max</i>	467	73	23	[69]
<i>Populus trichocarpa</i>	379	42	33	[36]
<i>Brassica rapa</i>	303	25	36	[70]
<i>Solanum lycopersicum</i>	256	54	8	[37]
<i>Oryza sativa</i>	384	127	42	[38]
<i>Theobroma cacao</i>	253	63	12	[71]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	209	9	38	This work
<i>Citrus clementina</i>	300	148	9	This work
<i>Citrus sinensis</i>	297	140	11	This work

Evolutionary aspects of *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-XII

Analysis of LRR-XII orthologs

Based on the large expansion of *Citrus* LRR-XII and its important role in response to biotic stresses, we further focused on homology studies involving this receptor group. Initially, we searched for orthologs through integrated analyses of phylogeny, sequence similarity and chromosomal distribution in the *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-XII subfamily.

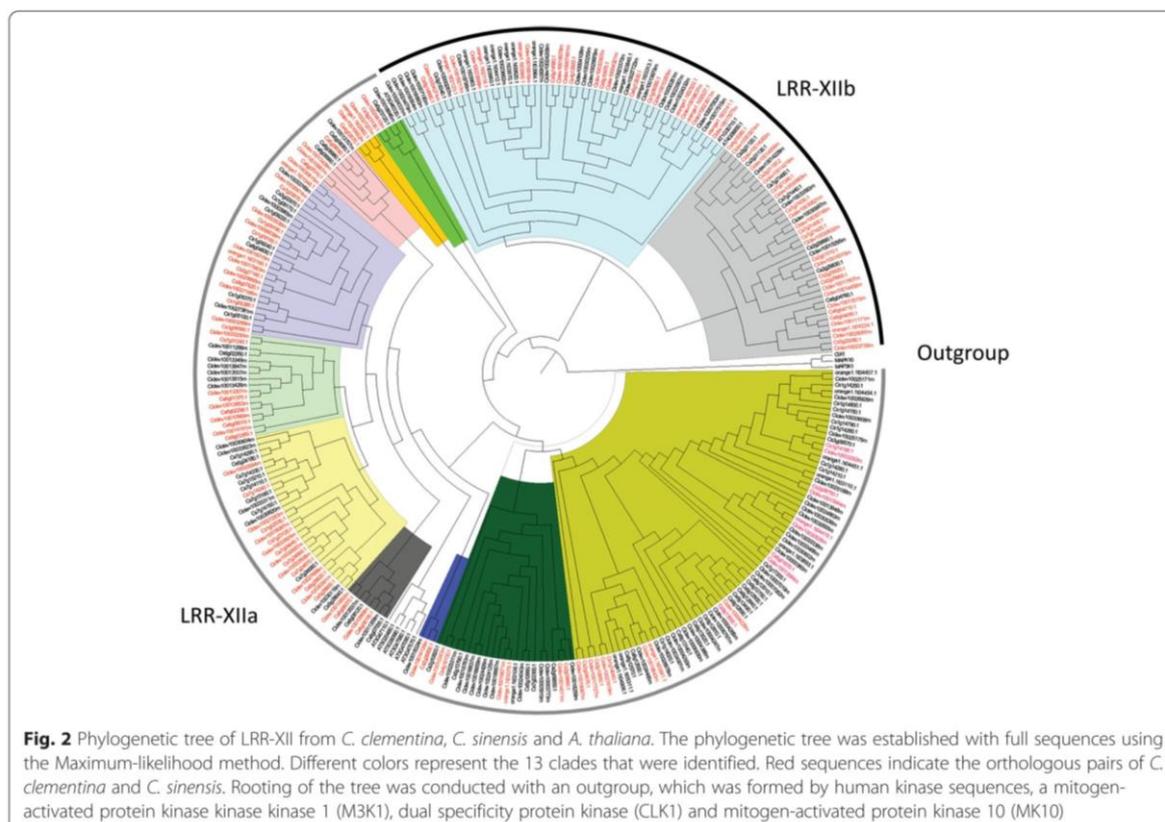
Understanding evolutionary aspects, such as paralogy and orthology relationships between genes, is important to deduce the evolution of species [48]. The clades of the phylogenetic tree formed by *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-XII sequences in association with the Bidirectional Best Hits (BBH) method were used to detect the LRR-XII orthologs. A total of 68 paired sequences were identified whose similarity was confirmed through 13 well-supported clade grouping of the sequences from the reconstructed phylogenetic tree (Fig. 2; Additional file 7).

The tree topology allowed us to distinguish two monophyletic groups, one formed by two clades (light blue and light gray), related to the LRR-XIIb members and the other formed by the remaining eleven clades, which represent the LRR-XIIa (Fig. 2), as can also be observed in Fig. 1. LRR-XIIa harbors seven of the nine members from the previously assigned *A. thaliana* LRR-XII group. LRR-XIIb harbors the two remaining members of the group, At1g35710 and At4g08850, indicating a non-monophyletic origin for the LRR-XII subfamily. This distinct grouping of LRR-XII members was also observed in phylogenetic analysis using tomato [37] and *A. thaliana* [15].

The two *Arabidopsis* members mentioned above and the correspondent *Citrus* members from the same clade (light gray and light blue in Fig. 2), did not share enough similarity with the other LRR-XII members. Previous work showed that these two members fell in the LRR-XI group [15] and they should comprise an independent group of LRR-RLKs. Based on this approach, the resulting LRR-XII group from *C. clementina* and *C. sinensis* would comprise 123 and 126 members, respectively.

LRR-XII kinase RD motif analysis

Non-arginine-aspartate (non-RD) kinases are kinases that lack the highly conserved arginine (R) that precedes the catalytic aspartate (D), which is typical of most kinases [49]. This subclass of kinases is often found as part of pattern recognition receptors [50, 51]. Considering the high incidence of pathogens that cause diseases to *Citrus* and their importance in the recognition of conserved microbial patterns, it is important to identify these classes of kinase proteins in the *C. clementina* and



C. sinensis LRR-XII groups. A total of 93 of 148 and 94 of 140 LRR-XII elements were classified as non-RD in *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively (Additional file 8), which represents approximately 70 % in both *Citrus* LRR-XII groups. Usually, non-RD kinases carry the cysteine (C) or a glycine (G) amino acid residue in the substitution of the highly conserved arginine (R) in the HRD motif [50] and the same is observed for both *Citrus* species, in which non-RD carrying C or G in place of R accounts for over 95 % (Fig. 3). However, in a few cases, tryptophan (Y) or serine (S) substitutes for R (less than 2 %).

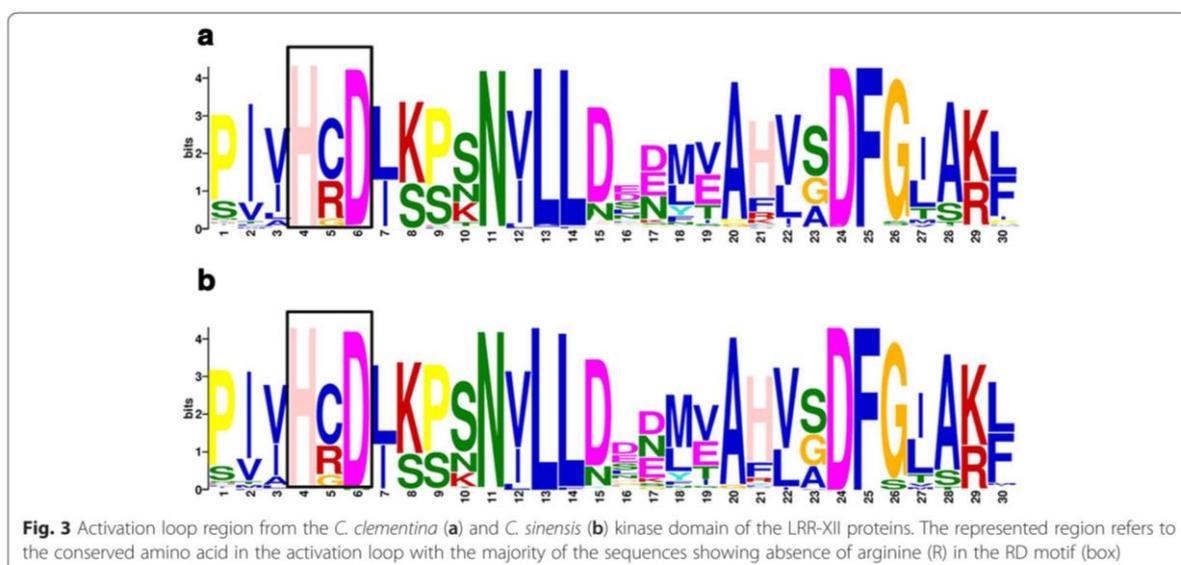
These changes can affect the charge of the molecules and potentially modify the kinase regulatory and catalytic mechanisms [50]. Only 7 members from *C. clementina* and 9 members from *C. sinensis* have a kinase with an alternative catalytic function (ACF), which did not show either RD or non-RD motifs. The non-RD kinases identified in *Citrus* LRR-XII open new possibilities for further studies involving the function of these receptors in defense responses by recognition of microbial signatures.

In addition to the identification of RD and non-RD kinases in the *Citrus* LRR-XII group, we analyzed the

LRR-XII RD and non-RD kinase motifs in *A. thaliana*. Only two sequences showed the RD motif, while all the other seven were non-RD kinases, as already identified by other authors [15, 50]. These two RD kinases correspond to RLK members, which were grouped in a separated clade of the phylogenetic trees (At4g08850.1 and At1g35710.1) (Fig. 2). Additionally, all the non-RD kinases were grouped in the clade that contained LRR-XIIa (Fig. 2). Curiously, and in agreement with this classification, 98 % and 100 % of the RD members from *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively, were grouped across LRR-XIIb. For the non-RD kinases, 97 % and 99 % from *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively, were grouped across LRR-XIIa. This separation of the *Citrus* RD and non-RD kinases in two distinct clades, as observed in *A. thaliana*, suggests a possible common phylogenetic origin for each of the RD and non-RD kinases in the LRR-XII group.

LRR-XII tandem duplication paralogs in *C. clementina* and *C. sinensis*

We analyzed the paralogous sequences in the *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-XII group because they can



evolve new functions in relation to the ancestor proteins [52] (Additional files 9 and 10).

We identified 78 and 62 LRR-XII tandem duplicated sequences in the genomes of *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively. Because both species are hybrids derived from a cross of *C. reticulata* and *C. maxima*, it is difficult to make any assumptions about when, in the evolutionary history of the group, these duplications appeared, even though it is known that they have the same parents [27]. An analysis of the chromosomal distribution of LRR-XII allowed us to detect tandem duplications of this gene family on the chromosomes from *C. clementina* (Fig. 4a) and *C. sinensis* (Fig. 4b).

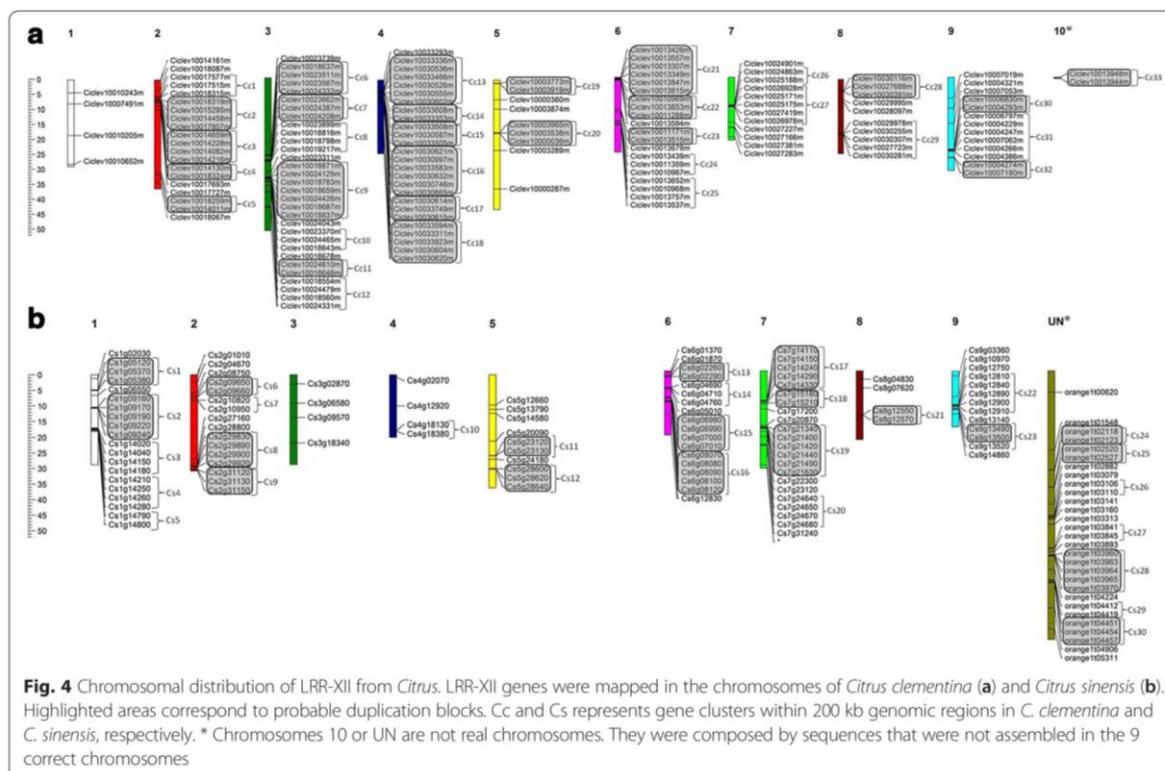
The *Citrus* LRR-XII receptors are distributed in all chromosomes but are mainly concentrated on chromosome 3 for *C. clementina* and on chromosome Un (for unassigned contigs) for *C. sinensis*. Chromosomes 4 and Un from *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively, displayed the majority of the tandem duplicated genes. Duplication events seem to be pronounced in domesticated plant species [53]. Segmental duplication events must have contributed to the acquisition of novel and distinct functions in relation to the ancestor by neofunctionalization or sub-functionalization [54]. Considering the large number of pathogens in citrus crops, the observed large expansion of *Citrus* LRR-XII might be regarded as a plant-specific adaptation to extracellular signal perception, for example, to recognize different PAMPs [16].

Identification and distribution of LRR-XII gene clusters

Gene duplication is an important strategy for adaptive evolution in plants [55]. To identify clusters that

encompass LRR-XII tandem duplicated genes, we grouped these genes in each *Citrus* genome into the same cluster if they were arranged in a genomic fragment with a maximum of 200 Kb. LRR-XII gene clusters are present in all chromosomes, with the exception of chromosomes 1 and 3 from *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively (Fig. 4; Additional file 11). A distribution analysis revealed 117 of 148 LRR-XII genes of *C. clementina* (79 %) were found in 33 cluster regions, and for *C. sinensis*, 94 of 140 LRR-XII genes (67.1 %) were distributed in 30 clusters. Tandem duplications seem to be an important mechanism for expansion of the LRR-XII group, which could be confirmed by the presence of the LRR-XII gene in clusters. Approximately 70 % and 63 % of these clusters are formed by tandem duplicated paralogs in the *C. clementina* and *C. sinensis* genomes, respectively. Wang et al. [56] also demonstrated high clustering and the importance of duplication events in the expansion of *Citrus* nucleotide binding site (NBS) genes, which is a large class of intracellular immune receptor genes that also display LRR domains beyond the nucleotide-binding site domain. Clustering in NBS gene loci has been reported in many species, including *Arabidopsis* and rice [55]. On the other hand for LRR-XII genes, this expansion is not widespread in plants as the NBS genes are mainly observed in rice [57] and citrus.

Of the 68 LRR-XII orthologous pairs identified for *C. clementina* and *C. sinensis*, 46 and 38 genes from *C. clementina* and *C. sinensis*, respectively, were located in cluster regions (Additional file 7). We identified orthologous pairs in the same clusters, which suggested high conservation and correspondence of these clusters between *C. sinensis* and *C. clementina* genomes. These

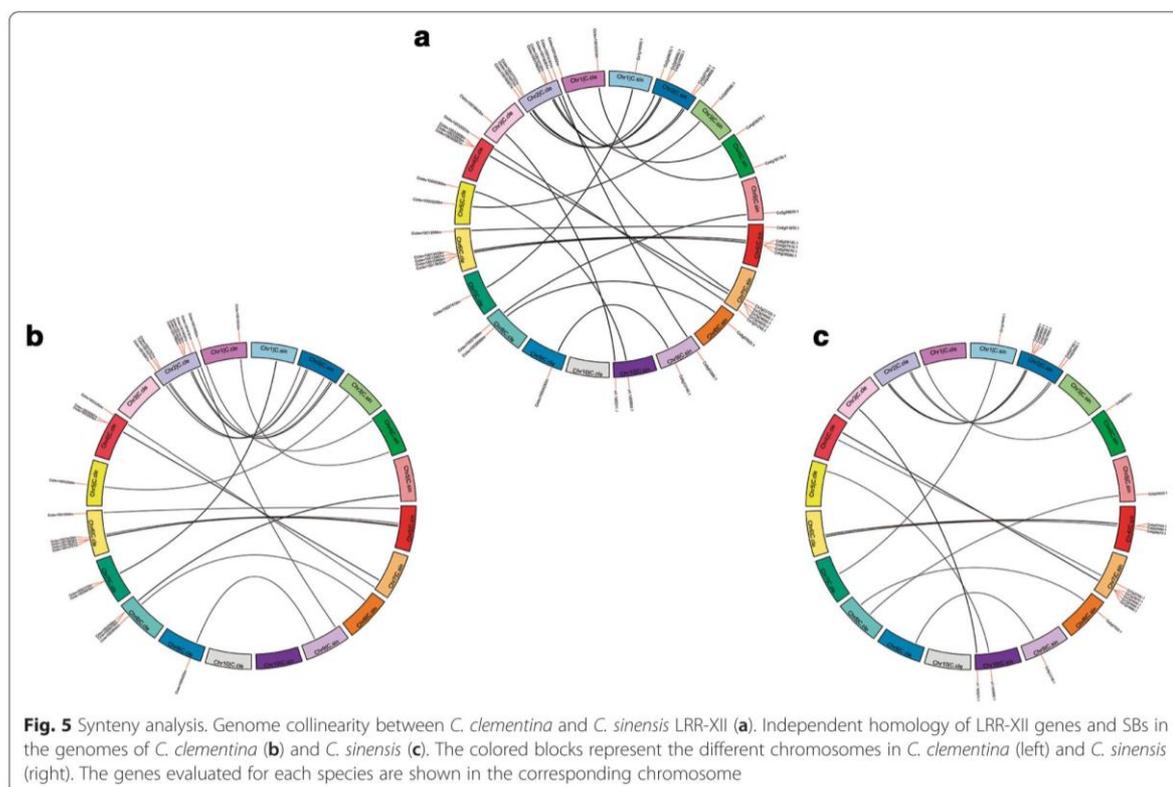


data suggested blocks of elevated homology among *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-XII sequences and chromosome regions.

Syntenic blocks in LRR-XII and *Citrus* genomes

The establishment of synteny relations between species is an important tool to improve the understanding of genome evolution and the conserved biological functions among species [58]. To better understand the evolution of *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-XII, we searched for syntenic blocks in the chromosomes. The similarity identified among LRR-XII gene sequences from one species in the genome of another species allowed us to identify conserved blocks in the *C. clementina* and *C. sinensis* chromosomes (Fig. 5). When analyzing the collinearity between both genomes, 25 syntenic blocks (SBs) were found between LRR-XII from *C. sinensis* and *C. clementina* (Fig. 5a). Of the 68 orthologous pairs previously identified by BBH and phylogeny, only 20 were also verified within these pairwise syntenic genes (Additional file 12). The different number of SBs identified resulted from a more stringent algorithm in this analysis. In addition, another analysis using the *Citrus* species independently found a total of 39 SBs in the chromosomes of *C. clementina* when evaluated with the 140 *C. sinensis* LRR-XII genes. A comparable number of 40 SBs was

verified in the *C. sinensis* genome matching the 148 *C. clementina* LRR-XII genes. Some LRR-XII genes from both *Citrus* genomes matched more than one locus in the chromosomes and each locus was considered an independent SB. The number of LRR-XII genes that displayed similarity with the genome was of 26 of 148 LRR-XII genes from *C. clementina* and 25 of 140 LRR-XII genes for *C. sinensis* (Additional file 12). These numbers might be higher because we used a stringent analysis to increase the reliability of the results and avoid false positive SBs. In general, a reciprocal homology was observed in the SBs between *C. sinensis* and *C. clementina* chromosomes. We observed SBs distributed throughout almost all the chromosomes of the *Citrus* genomes (Fig. 5b-c). The highest number of SBs was found in chromosome 6 in both species, with 17 SBs for *C. clementina* and 16 for *C. sinensis*. The *C. sinensis* chromosome 2 matched the highest number of *C. clementina* LRR-XII, presenting homology with 6 sequences. For *C. clementina*, in addition to chromosome 2, chromosome 6 also exhibited the highest number of matches with *C. sinensis* LRR-XII, each of them displaying linkage with 6 genes in the corresponding chromosomes (Fig. 5b-c). Curiously, genes belonging to the same chromosome in one species matched SBs in different chromosomes from the other species, as in chromosome 2 from *C.*



clementina and chromosomes 5, 8 and 10 from *C. sinensis* (Fig. 5b-c). In the case of chromosome 2 from *C. clementina*, one LRR-XII gene matched an SB in chromosome 9 from *C. sinensis*, while all the others matched SBs in chromosome 2. Chromosomes 10 or UN are particular because they are composed of sequences that were not assembled in the correct chromosomes. Therefore, it is an artifact from the genome assembly because the *Citrus* genome has only 9 chromosomes, thus the LRR-XII genes identified in this chromosome must be located in other genomic regions. On the other hand, genes in chromosomes 5 and 8 from the *C. sinensis* genome matched SBs in the same chromosome of *C. clementina* (Chr 8). This miscorrelation of some LRR-XII genes and SBs in the same chromosomes could be a result of chromosomal rearrangements in the genomes.

Conclusions

This work provides the first comprehensive evolutionary analysis of the LRR-RLKs in *Citrus*. Lineage-specific expansion was observed in the *Citrus* LRR-XII group that might have occurred due to tandem duplications making the number of individuals larger compared to the majority of plant species. Considering the diverse number of pathogens affecting the domesticated citrus culture, the

independent expansion of a defense-related group could be associated with an adaptive process related to plant-pathogen co-evolution. Our comparative data provided valuable information concerning these RLKs, opening new perspectives in the study of their function in diverse processes, such as development and defense responses in two worldwide important economic crops, specifically, sweet oranges and clementines.

Methods

Sequence database search

Predicted proteomes from *Citrus clementina* (Version 1.0, https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Cclementina), *Citrus sinensis* (Version CsiDB201301, <http://citrus.hzau.edu.cn/orange/download/data.php>) [26] and *Arabidopsis thaliana* (<http://arabidopsis.org>) were selected and downloaded. The InterProScan 4 package software (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/download.html>) was used to identify different protein signatures in each proteome dataset [59]. To recover and analyze the dataset, we developed local relational databases for each included plant species. It allowed us to extract and interpret the large amount of data obtained in this work. In-house Perl scripts and Structured Query Language (SQL) queries were used to analyze data files during the database building and

searching processes. Access to these local relational databases was implemented using DbVisualizer version 9.1.7 (<http://dbvis.com/>).

Domain annotation and LRR-RLK retrieval

The LRR-RLK homologues were retrieved from the relational databases by searching for protein sequences with kinase, transmembrane and leucine-rich repeat domains. To recover the identifiers with KD, we considered Pkinase (PF00069) and Pkinase_Tyr (PF07714), according to the Pfam platform [60], as diagnostic domains. TMs were predicted from the TMHMM website (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) hosted at the Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark. The prediction of transmembrane helices in the protein sequences were conducted according to the default parameters of version 2.0, without considering the old model option (version 1).

The following LRR diagnostic domains were searched: LRR_1 - Leucine Rich Repeat (PF00560), LRRNT - Leucine rich repeat N-terminal domain (PF01462), LRV - Leucine rich repeat variant (PF01816), LRRNT_2 - Leucine rich repeat N-terminal domain (PF08263), LRR_4 - Leucine rich repeats (2 copies) (PF12799), LRR_5 - Leucine rich repeats (6 copies) (PF13306), LRR_8 - Leucine rich repeat (PF13855), LRR_9 - Leucine-rich repeat (PF14580), LRRCT - Leucine rich repeat C-terminal domain (PF01463), LRR_2 - Leucine Rich repeat (PF07723), and LRR_3 - Leucine Rich repeat (PF07725). Only proteins containing LRRs, TM and KD were then considered to be putative LRR-RLK, and for this reason, At2g24130, which did not show TM, was not included in our analyses. Alternative splicing variants were excluded from our analysis.

Kinase domain alignment and phylogenetic analysis

Sequences of conserved KDs from *Arabidopsis* and *Citrus* LRR-RLK proteins were extracted by an in-house Perl script that consider KD coordinates annotation from the Pfam database. In addition, six human kinase protein sequences were used as an outgroup (Additional file 13). The KD sequences were aligned using MAFFT version 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) with G-INS-i strategy and default parameters [61]. The aligned sequences were visualized and manually refined using Jalview version 15.0 [62]. The proteins with a short length (<100 aa) or large inserted gap regions were removed. Gap-rich columns were further filtered using trimAl v.1.3 with the gappout method [63]. To optimize the datasets for evolutionary analyses, the Decrease Redundancy tool, available as a resource at ExPaSy (www.expasy.org), was used to remove identical or distantly related sequences. The Decrease Redundancy parameters were set as 99 for “% max similarity” and 30

for “% min similarity”. Phylogenetic analyses were performed using the Maximum-likelihood method, as implemented in PhyML [64]. Twelve different evolutionary models (JTT, LG, DCMut, MtREV, MtMam, MtArt, Dayhoff, WAG, RtREV, CpREV, Blosum62 and VT) were tested using ProtTest 2.4 software [65]. The evolutionary model best fitting the data (best fit model) was determined by comparing the likelihood of the tested models according to the Akaike Information Criterion. A discrete gamma-distribution model with four rate categories plus invariant positions was assumed with the gamma parameter and the fraction of invariant positions was estimated from the data. Tree support values were estimated using approximate likelihood ratio test (ALRT), as implemented in PhyML. The ML trees were visualized and edited using the FigTree software (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree). The alignments are available at FigShare (10.6084/m9.figshare.3474752).

Identification of the RD motif in the kinase domain

Identification of the *Citrus* RD motif in the catalytic loop from the LRR-XII kinase subdomain was performed using multiple expectation maximization for motif (MEME) suite web server using default parameters [66]. The kinases were classified as RD or non-RD according to the presence or absence of the Arg (R) in the conserved HRD motif, respectively.

Chromosomal distribution of LRR XII

The genomic coordinates of each LRR-XII gene from *C. clementina* and *C. sinensis* were used to determine their distribution in the *Citrus* chromosomes. The coordinates were retrieved accessing the genome browser from each *Citrus* database. The MapChart graphical tool [67] was used to generate schematic diagrams to represent the LRR-XII gene positions in the chromosomes.

LRR-XII orthologs and tandem duplicated paralogs

The identification of orthologous pairwise sequences among *Citrus* species was achieved through grouping in the phylogenetic tree and the BBH method. The Blastp searches were performed using all the *C. sinensis* and *C. clementina* LRR-RLK sequence proteins from group XII. For tandem duplicated paralogs searches, the results from Blastp were analyzed together with well-supported clades from the LRR-XII phylogenetic trees. The tandem duplicated paralogs were eligible when they formed the same clade and showed proximity in their chromosomal location. The identification of the LRR-XII gene clusters was performed from the arrangement of these genes in the chromosomes of each species. The LRR-XII genes were grouped in the same cluster if the genome location between two genes was within 200 kb in the chromosomes of *C. sinensis* and *C. clementina*.

LRR-XII gene synteny identification

The synteny analyses were performed using *Sibelia* software. Although this tool was originally optimized to efficiently identify syntenic blocks between closely related microbial genomes [68], this tool was employed because the chromosome comparisons were restricted to a small gene family of *Citrus* species with evolutionary proximity.

The minimal nucleotide length considered in the syntenic block was adjusted to 1,000 pb. Iterative de Bruijn graphs were used to show the homology results found across the LRR-XII and the genomic regions in the chromosomes.

Additional files

Additional file 1: Amino acid sequences from *Arabidopsis thaliana* LRR-RLKs. Dataset containing 209 LRR-RLK sequences obtained from <http://arabidopsis.org/>. (XLSX 137 kb)

Additional file 2: Amino acid sequences from *C. clementina*, *C. sinensis* and *A. thaliana* kinase domains. The sequences were obtained by in-house Perl scripts using kinase coordinates from pfam database. (XLSX 108 kb)

Additional file 3: Phylogenetic tree of LRR-RLKs from *Citrus clementina* and *Arabidopsis thaliana*. The phylogenetic tree was reconstructed with amino acid sequences from kinase domains by Maximum-likelihood method. The groups of LRR-RLK subfamily (I – XVI) are separated in different colors. Tree support values (aLRT) are indicated. (PDF 68 kb)

Additional file 4: Phylogenetic tree of LRR-RLKs from *Citrus sinensis* and *Arabidopsis thaliana*. The phylogenetic tree was reconstructed with amino acid sequences from kinase domains by Maximum-likelihood method. The groups of LRR-RLK subfamily (I – XVI) are separated in different colors. Tree support values (aLRT) are indicated. (PDF 66 kb)

Additional file 5: Phylogenetic tree of LRR-RLKs from *Citrus clementina*, *Citrus sinensis* and *Arabidopsis thaliana*. The phylogenetic tree was reconstructed with amino acid sequences from kinase domains by Maximum-likelihood method. The groups of LRR-RLK subfamily (I – XVI) are separated in different colors. (PDF 69 kb)

Additional file 6: Complete list and classification of LRR-RLKs from *C. clementina*, *C. sinensis* and *A. thaliana*. *Citrus* sequences were categorized in 16 groups of LRR-RLKs. (XLSX 55 kb)

Additional file 7: Pairwise list of orthologues LRR-XII subfamily members of *C. clementina* and *C. sinensis*. The colors represent the gene position in the same phylogenetic group (Fig. 2). * represents genes in clusters. (XLSX 11 kb)

Additional file 8: Classification of kinases from *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-RLK as RD, non-RD and ACF. The kinases classification was done according to the presence or absence of the Arg (R) in the conserved HRD motif. (XLSX 13 kb)

Additional file 9: Statistics of the tandem duplicated paralogues sequences from *C. clementina* LRR-XII. Comparative data generated by Blastp using all *C. clementina* LRR-XII. (XLSX 13 kb)

Additional file 10: Statistics of the tandem duplicated paralogues from *C. sinensis* LRR-XII. Comparative data generated by Blastp using all *C. sinensis* LRR-XII. (XLSX 12 kb)

Additional file 11: List of *C. clementina* and *C. sinensis* LRR-XII localized in cluster region. The chromosome distance of 200 kb was used as a reference to include the LRR-XII genes in the same cluster region. (XLSX 12 kb)

Additional file 12: Syntenic blocks (SBs) of LRR-XII from *C. sinensis* and *C. clementina*. SBs were obtained from genome collinearity and independent homology analysis. (XLSX 18 kb)

Additional file 13: Amino acid sequences of human kinase proteins. Sequences used as outgroup in the phylogenetic analysis with *Citrus* and *Arabidopsis* LRR-RLKs. (XLSX 10 kb)

Abbreviations

ACF, alternative catalytic function; ALRT, approximate likelihood ratio test; BBH, bidirectional best hits; BLAST, basic local alignment search tool; C, cysteine; CsIDB, citrus sinensis database; ECD, extracellular domain; EFR, EF-Tu receptor; EF-Tu, elongation factor thermo unstable; FLS2, flagellin sensing 2; FRK1, flg22-induced receptor-like kinase 1; G, glycine; HRD, histidine-arginine-aspartate; IOS1, impaired oomycete susceptibility 1; Kb, kilobase; KD, kinase domain; LRRCT, leucine-rich repeat C-terminal; LRRNT, leucine-rich repeat N-terminal; LRR-RLK, leucine-rich repeat receptor-like kinases; LRV, leucine-rich repeat variant; MAFFT, multiple alignment using fast fourier transform; MAMP, microbe-associated molecular pattern; MEME, multiple expectation maximization for motif elicitation; ML, maximum-likelihood; NBS, nucleotide binding site; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PRR, pattern-recognition receptor; R, arginine; RD, arginine-aspartate; RLCK, receptor-like cytoplasmic kinase; RLK, receptor-like kinase; S, serine; SB, syntenic block; SQL, structured query language; TAIR, the Arabidopsis information resource; TM, transmembrane; Un, unassigned; Y, tryptophan.

Acknowledgments

The authors thank Nicholas Holton for critical reading of the manuscript before submission. The authors have no conflict of interest.

Funding

This work was supported by research grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2013/17485-7). D.M.M is a fellow PhD from FAPESP (2013/01412-0). A.A.S., G.C.O. and M.A.T. are recipient of research fellowships from CNPq.

Research in the Zipfel laboratory is funded by the Gatsby Charitable Foundation and the Two Blades Foundation.

Availability of data and materials

Phylogenetic data have been deposited to FigShare and are accessible via <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.3474752.v1>. Additional supporting data are included as Additional files.

Authors' contributions

AAS and MAT planned and supervised the study. AAS, MAT, LLSS and GCO contributed to the design of the analysis. DMM and LLSS performed the analysis of the data. NVS carried out the synteny analysis. DMM drafted the manuscript. DMM, AAS, MAT, LLSS and CZ contributed to the interpretation of the data and provided intellectual input. AAS, MAT and CZ revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Author details

¹Instituto Agronômico, Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Cordeirópolis, São Paulo, Brazil. ²Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. ³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, Grupo de Genômica e Biologia Computacional, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁴Instituto Tecnológico Vale – ITV, Belém, Pará, Brazil. ⁵The Sainsbury Laboratory, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, UK.

Received: 22 January 2016 Accepted: 12 July 2016

Published online: 12 August 2016

References

- Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran L-SP. Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *J Exp Bot*. 2013;64:445–58.
- Shiu SH, Bleecker AB. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:10763–8.
- Walker JC. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol Biol*. 1994;26:1599–609.
- Shiu SH, Bleecker AB. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE*. 2001. doi:10.1126/stke.2001.113.re22.
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM. The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell*. 1997;89:575–85.
- van der Knaap E, Song WY, Ruan DL, Sauter M, Ronald PC, Kende H. Expression of a gibberellin-induced leucine-rich repeat receptor-like protein kinase in deepwater rice and its interaction with kinase-associated protein phosphatase. *Plant Physiol*. 1999;120:559–70.
- Li J, Wen J, Lease KA, Doko JT, Tax FE, Walker JC. BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. *Cell*. 2002;110:213–22.
- Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K, Yamaguchi-shinozaki K. Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase1 Is a Key Membrane-Bound Regulator of Abscisic Acid Early Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2005;17:1105–19.
- Pitorre D, Llauro C, Jobet E, Guilleminot J, Brizard J-P, Delseny M, Lasserre E. RLK7, a leucine-rich repeat receptor-like kinase, is required for proper germination speed and tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 2010;232:1339–53.
- Ouyang SQ, Liu YF, Liu P, Lei G, He SJ, Ma B, Zhang WK, Zhang JS, Chen SY. Receptor-like kinase OsS1K1 improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *Plant J*. 2010;62:316–29.
- de Lorenzo L, Merchan F, Laporte P, Thompson R, Clarke J, Sousa C, Crespi M. A novel plant leucine-rich repeat receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* plants to salt stress. *Plant Cell*. 2009;21:668–80.
- Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:10–6.
- Roux M, Schwessinger B, Albrecht C, Chinchilla D, Jones A, Holton N, Malinovsky FG, Tör M, de Vries S, Zipfel C. The arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic pathogens. *Plant Cell*. 2011;23:2440–55.
- Lehti-Shiu MD, Zou C, Hanada K, Shiu S-H. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiol*. 2009;150:12–26.
- Gou X, He K, Yang H, Yuan T, Lin H, Clouse SD, Li J. Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*. 2010;11:19.
- Shiu S, Bleecker AB. Expansion of the Receptor-Like Kinase/Pelle Gene Family and Receptor-Like Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2003;132:530–43.
- Boller T, Felix G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol*. 2009;60:379–406.
- Zipfel C. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol*. 2014;35:345–51.
- Holt III BF, Mackey D, Dangl JL. Recognition of pathogens by plants. *Curr Biol*. 2000;10:R5–7.
- Goff KE, Ramonell KM. The role and regulation of receptor-like kinases in plant defense. *Gene Regul Syst Biol*. 2007;1:167–75.
- Gómez-Gómez L, Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell*. 2000;5:1003–11.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Cianiard A, Jones JDG, Boller T, Felix G. Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell*. 2006;125:749–60.
- Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*. 1995;270(5243):1804–6.
- Talon M, Gmitter FG. Citrus genomics. *Int J Plant Genomics*. 2008;2008:528361.
- Liu Y, Heying E, Tanumihardjo AS. History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2012;11(6):530–45.
- Xu Q, Chen L-L, Ruan X, Chen D, Zhu A, Chen C, Bertrand D, Jiao W-B, Hao B-H, Lyon MP, Chen J, Gao S, Xing F, Lan H, Chang J-W, Ge X, Lei Y, Hu Q, Miao Y, Wang L, Xiao S, Biswas MK, Zeng W, Guo F, Cao H, Yang X, Xu X-W, Cheng Y-J, Xu J, Liu J-H, et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nat Genet*. 2013;45:59–66.
- Wu GA, Prochnik S, Jenkins J, Salse J, Hellsten U, Murat F, Perrier X, Ruiz M, Scalabrin S, Terol J, Takita MA, Labadie K, Poulain J, Couloux A, Jabbari K, Cattonaro F, Del Fabbro C, Pinosio S, Zuccolo A, Chapman J, Grimwood J, Tadeo FR, Estornell LH, Muñoz-Sanz JV, Ibanez V, Herrero-Ortega A, Aleza P, Pérez-Pérez J, Ramón D, Brunel D, et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nat Biotechnol*. 2014;32:656–62.
- Pitino M, Armstrong CM, Duan Y. Rapid screening for citrus canker resistance employing pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity responses. *Hortic Res*. 2015;2:15042.
- Shi Q, Febres VJ, Jones JB, Moore GA. Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. *Mol Plant Pathol*. 2015;16:507–20.
- Cuenca J, Aleza P, Vicent A, Brunel D, Ollitrault P, Navarro L. Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3.3-mb genome region linked to Alternaria brown spot resistance in citrus reveal clusters of resistance genes. *PLoS One*. 2013;8:e76755.
- Folimonova SY, Robertson CJ, Gamsey SM, Gowda S, Dawson WO. Examination of the Responses of Different Genotypes of Citrus to Huanglongbing (Citrus Greening) Under Different Conditions. *Phytopathology*. 2009;99:1346–54.
- Gmitter FG, Chen C, Machado MA, de Souza AA, Ollitrault P, Froehlicher Y, Shimizu T. Citrus genomics. *Tree Genet Genomes*. 2012;8:611–26.
- Rodrigues CM, de Souza AA, Takita MA, Kishi LT, Machado MA. RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. *BMC Genomics*. 2013;14:676.
- Velasco R, Licciardello C. A genealogy of the citrus family. *Nat Biotech*. 2014;32:640–2.
- Diévert A, Gilbert N, Droc G, Attard A, Gourgues M, Guiderdoni E, Périn C. Leucine-rich repeat receptor kinases are sporadically distributed in eukaryotic genomes. *BMC Evol Biol*. 2011;11:367.
- Zan Y, Ji Y, Zhang Y, Yang S, Song Y, Wang J. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of populus leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes. *BMC Genomics*. 2013;14:318.
- Sakamoto T, Deguchi M, Brustolini OJB, Santos AA, Silva FF, Fontes EPB. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-RLK subfamily in antiviral defense. *BMC Plant Biol*. 2012;12:229.
- Shiu S, Karlowski WM, Pan R, Tzeng Y, Mayer KFX, Li W. Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Cell*. 2004;16:1220–34.
- Fischer I, Diévert A, Droc G, Dufayard J-F, Chantret N. Evolutionary dynamics of the Leucine-Rich Repeats Receptor-Like Kinase (LRR-RLK) subfamily in angiosperms. *Plant Physiol*. 2016;170:1595–610.
- Nemoto K, Seto T, Takahashi H, Nozawa A, Seki M, Shinozaki K, Endo Y, Sawasaki T. Autophosphorylation profiling of Arabidopsis protein kinases using the cell-free system. *Phytochemistry*. 2011;72:1136–44.
- Lehti-Shiu MD, Shiu S-H. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367:2619–39.
- Vij S, Giri J, Dansana PK, Kapoor S, Tyagi AK. The receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK) gene family in rice: organization, phylogenetic relationship, and expression during development and stress. *Mol Plant*. 2008;1:732–50.
- Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2000;408:796–815.
- Hok S, Danchin EGJ, Allasia V, Panabières F, Attard A, Keller H. An Arabidopsis (malectin-like) leucine-rich repeat receptor-like kinase contributes to downy mildew disease. *Plant Cell Environ*. 2011;34:1944–57.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu W-L, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature*. 2002;415:977–83.
- Pruitt RN, Schwessinger B, Joe A, Thomas N, Liu F, Albert M, Robinson MR, Chan LIG, Luu DD, Chen H, Bahar O, Daudi A, Vleeschauwer D De, Caddell D, Zhang W, Zhao X, Li X, Heazlewood JL, Ruan D, Majumder D, Chern M, Kalbacher H, Midha S, Patil PB, Sonti R V, Petzold CJ, Liu CC, Brodbelt JS, Felix G, Ronald PC. The rice immune receptor XA21 recognizes a tyrosine-sulfated protein from a Gram-negative bacterium. *Sci Adv*. 2015; doi: 10.1126/sciadv.1500245.

47. Guo YL. Gene family evolution in green plants with emphasis on the origination and evolution of *Arabidopsis thaliana* genes. *Plant J.* 2013;73:941–51.
48. Gabaldón T, Koonin EV. Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nat Rev Genet.* 2013;14:360–6.
49. Schwessinger B, Ronald PC. Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. *Annu Rev Plant Biol.* 2012;63:451–82.
50. Dardick C, Ronald P. Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathog.* 2006;2:14–28.
51. Dardick C, Schwessinger B, Ronald P. Non-arginine-aspartate (non-RD) kinases are associated with innate immune receptors that recognize conserved microbial signatures. *Curr Opin Plant Biol.* 2012;15:358–66.
52. Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ. A Genomic Perspective on Protein Families. *Science.* 1997;278:631–8.
53. Corbi J, Debieu M, Rousselet A, Montalent P, Le Guilloux M, Manicacci D, Tenaillon ML. Contrasted patterns of selection since maize domestication on duplicated genes encoding a starch pathway enzyme. *Theor Appl Genet.* 2011;122:705–22.
54. Rastogi S, Liberles DA. Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization. *BMC Evol Biol.* 2005. doi:10.1186/1471-2148-5-28
55. Wendel JF, Flagel LE, Wendel JF. Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol.* 2009;183:557–64.
56. Wang Y, Zhou L, Li D, Dai L, Lawton-Rauh A, Srirani PK, Duan Y, Luo F. Genome-Wide Comparative Analysis Reveals Similar Types of NBS Genes in Hybrid *Citrus sinensis* Genome and Original *Citrus clementine* Genome and Provides New Insights into Non-TIR NBS Genes. *PLoS One.* 2015. doi:10.1371/journal.pone.0121893.
57. Hwang S-G, Kim DS, Jang CS. Comparative analysis of evolutionary dynamics of genes encoding leucine-rich repeat receptor-like kinase between rice and *Arabidopsis*. *Genetica.* 2011;139:1023–32.
58. Schmidt R. Synteny: recent advances and future prospects. *Curr Opin Plant Biol.* 2000;3:97–102.
59. Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R. InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:116–20.
60. Punta M, Coghill PC, Eberhardt RY, Mistry J, Tate J, Boursnell C, Pang N, Forslund K, Ceric G, Clements J, Heger A, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A, Finn RD. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:290–301.
61. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30:772–80.
62. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009;25:1189–91.
63. Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics.* 2009;25:1972–3.
64. Guindon S, Gascuel O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst Biol.* 2003;52:696–704.
65. Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics.* 2005;21:104–5.
66. Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW. MEME: Discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:369–73.
67. Voorrips RE. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered.* 2001;93:77–8.
68. Minkin I, Patel A, Kolmogorov M, Vyahhi N, Pham S. Sibelia: A scalable and comprehensive synteny block generation tool for closely related microbial genomes. *Proc 13th Workshop Algs in Bioinf (WABI'13) Lecture Notes in Comp Sci.* 2013;8126:215–29.
69. Zhou F, Guo Y, Qiu L. Genome-wide identification and evolutionary analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in soybean. *BMC Plant Biol.* 2016;16:1–13.
70. Rameneni JJ, Lee Y, Dhandapani V, Yu X, Choi SR. Genomic and Post-Translational Modification Analysis of Leucine-Rich-Repeat Receptor-Like Kinases in *Brassica rapa*. *PLoS One.* 2015;10:1–23.
71. Argout X, Salse J, Aury J, Guiltinan MJ, Droc G, Gouzy J, Allegre M, Chaparro C, Legavre T, Maximova SN, Abrouk M, Murat F, Fouet O, Poulain J, Ruiz M, Roguet Y, Rodier-goud M, Barbosa-neto JF, Sabot F, Kudrna D, Ammiraju JSS, Schuster SC, Carlson JE, Sallet E, Schiex T, Dievart A, Kramer M, Gelly L, Shi Z, Bérard A, et al. The genome of *Theobroma cacao*. *Nat Genet.* 2011;43:101–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Material suplementar

Todos os arquivos adicionais presentes no artigo “LRR-RLK family from two Citrus species: Genome-wide identification and evolutionary aspects” estão disponíveis na seção “ Additional files” da versão on-line e podem ser acessados a partir do seguinte endereço eletrônico:

<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-2930-9>

2. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1

- As LRR-RLKs foram identificadas e classificadas nos genomas de *C. clementina* e *C. sinensis*
- Grande similaridade na organização numérica entre a espécies de *C. clementina*, *C. sinensis* e *A. thaliana*
- LRR-XII de *C. sinensis* e *C. clementina* apresentam-se altamente expandidos
- Efeitos de duplicação em tandem foram importantes na evolução das LRR-XII de *C. clementina* e *C. sinensis*
- As árvores filogenéticas, em conjunto com método BBH, permitiram identificar 68 pares de ortólogos entre *C. clementina* e *C. sinensis*, dos quais 25 foram validados por análises de sintonia e colinearidade.
- Proteínas das classes RD e non-RD apresentam-se separadas em clados distintos na árvore filogenética reconstruída para as LRR-XII de *C. sinensis*, *C. clementina* e *A. thaliana*.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS DO CAPÍTULO 1

Através do agrupamento entre sequências de *C. sinensis* e *C. clementina* com as sequências previamente classificadas de LRR-RLKs em *A. thaliana* foi possível identificar os subgrupos de LRR-RLKs pertencentes às espécies de *Citrus*. Ainda, o agrupamento entre os subgrupos de LRR-RLKs observado entre as espécies de diferentes classes (Brassicaceae e Rutaceae) sugere que a formação dos subgrupos de LRR-RLKs já existia no ancestral antes do processo da separação das classes. E mesmo com a evolução independente nas espécies, ainda se observa similaridade suficiente nas sequências de LRR-RLKs que possibilitam seu agrupamento. Em relação às sequências específicas do subgrupo LRR-XII, das nove sequências de *Arabidopsis* considerada neste trabalho, seis foram agrupadas entre elas, sugerindo uma evolução específica dessas em Brassicaceae e que surgiu após a divergência das espécies de *Citrus*, o que faz sentido pelo menos para o receptor EFR que faz parte dessas sequências e foi identificado apenas em Brassicaceae. O

FLS2, por sua vez, é um receptor que parece ter surgido antes da divergência em um ancestral comum, e se manteve nestas bem como possivelmente na maioria das espécies de plantas. Neste trabalho, a sequência desse receptor em *Arabidopsis* (FLS2) se agrupa com duas sequências de cada uma das espécies de *Citrus*, sugerindo a presença dos ortólogos em *C. sinensis* e *C. clementina*.

A árvore filogenética reconstruída com as sequências de LRR-XII também permitiu identificar uma clara separação entre proteínas classificadas como RD daquelas classificadas como non-RD. Embora nos genomas de eucariotos o número de quinases que apresentam motivo HRD, e dessa forma classificadas como RD, seja superior (geralmente mais de 70 % do quinoma), curiosamente todas as PRRs identificadas reconhecendo ou associado com resposta de defesa contra patógenos são do tipo non-RD. Essa clara separação filogenética foi verificada em outros estudos e a observação nesse estudo abre uma perspectiva para seu potencial papel em respostas de defesa contra patógenos. Ou seja, este subgrupo dentro das LRR-XII destaca em *Citrus* os candidatos que poderiam ser avaliados em estudos funcionais relacionados com respostas de defesa da planta contra microrganismos.

CAPÍTULO 2 - ENVOLVIMENTO DO RECEPTOR EFR NO RECONHECIMENTO DE PAMP DE *Xylella fastidiosa* EM PLANTAS-MODELO

1. INTRODUÇÃO

A *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa de crescimento lento/fastidioso capaz de colonizar dois tipos distintos de ambientes, os vasos do xilema em plantas hospedeiras e o aparelho digestivo de insetos que se alimentam da seiva que circula pelo xilema (CHATTERJEE et al., 2008). Taxonomicamente, a *X. fastidiosa* pertence à classe das *gama-proteobactérias*, ordem *Xanthomonadales*, família *Xanthomonadaceae* e representa espécie única dentro do gênero *Xylella*. Pela proximidade evolutiva e similaridade de genoma, a bactéria *Xanthomonas spp.* é considerada um grupo-irmão de *X. fastidiosa* e da qual esta deve ter surgido (WELLS et al., 1987; RETCHLESS et al., 2014).

Transmitida inespecificamente por insetos vetores (cigarrinhas das famílias *Cicadellidae* e *Cercopidae*) que são distribuídos de forma abundante em diversas regiões de climas tropical ou temperado, a *X. fastidiosa* é uma bactéria generalista que pode colonizar uma ampla gama de hospedeiros (ALMEIDA & NUNNEY, 2015). Mais de 350 espécies de plantas já foram identificadas como hospedeiras para a *X. fastidiosa* e em algumas destas a bactéria causa doenças de grande impacto econômico, como a Doença de Pierce em videiras (*Vitis vinifera* L.), a clorose variegada de citros (CVC) em laranja-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], o “phony peach” em pessegueiros [*Prunus persicae* (L.) Batsch] e a escaldadura foliar em ameixeiras (*Prunus salicina* Lindl) e cafeeiros (*Coffea arabica* L.) (EFSA, 2016; PURCELL, 2013). E apesar de ser considerada um patógeno das Américas, a *X. fastidiosa* que já havia sido identificada em Taiwan, na Ásia, foi também recentemente reportada na Itália como agente causal do “rápido declínio das oliveiras (*Olea europea*)”. Esta doença apresenta um elevado poder destrutivo e ameaça dizimar a milenar cultura de oliveiras italianas (SU et al., 2014; SAPONARI et al., 2013).

A *X. fastidiosa* parece não causar doença em diversas espécies de plantas capazes de hospedá-la, entretanto, estas espécies são importantes no

estabelecimento de doenças em plantas cultivadas de interesse por representarem potenciais fontes de inóculo para os insetos vetores transmissores de *X. fastidiosa* (HOPKINS, 1989; LEITE *et al.*, 1997).

O preciso mecanismo de infecção da *X. fastidiosa* ainda não é totalmente esclarecido, apesar dos inúmeros estudos e da importância deste fitopatógeno no desenvolvimento de doenças de grande impacto em espécies cultivadas de interesse comercial. A *X. fastidiosa* representa o primeiro fitopatógeno a ser sequenciado e as informações obtidas com essas sequências comparadas com genomas de outras bactérias fitopatogênicas contribuíram para identificação de diversos fatores de virulência e genes associados, por exemplo, com sistemas de secreção no genoma deste fitopatógeno (VAN SLUYS *et al.*, 2003). Por exemplo, a *X. fastidiosa* possui o gene *tolC* que codifica um componente de membrana externa (*outer membrane*) do sistema de secreção do tipo I que é requerido para patogenicidade da bactéria em videiras (REDDY *et al.*, 2007). Além disso, diversos genes que codificam efetores do tipo I estão presentes no genoma da *X. fastidiosa*, incluindo toxinas da família Rtx, hemolisinas e bacteriocinas, o que sugere a importância deste sistema na patogenicidade desta bactéria (SIMPSON *et al.*, 2000). No genoma da *X. fastidiosa* estão presentes também os genes requeridos para os sistemas de secreção tipos II, envolvido com a secreção de lipases, celulasas, pectinases e fosfolipases; e do tipo V que está associado com a secreção principalmente de hemaglutininas, com papel importante principalmente associado a transmissão pelo inseto vetor (HENDERSON *et al.*, 2004). Já o sistema de secreção do tipo 3 (T3SS) que é de grande importância para patogenicidade de diversas bactérias gram-negativas está ausente no genoma de *X. fastidiosa* (SIMPSON *et al.*, 2000).

Além dos estudos *in silico*, os estudos *in vitro* e *in vivo* têm avançado a compreensão deste fitopatógeno e demonstram que o estabelecimento de doença depende, além da população bacteriana, da capacidade da *X. fastidiosa* em se movimentar e colonizar os vasos do xilema (HILL & PURCELL, 1995; BACCARI & LINDOW, 2011). Assim, os processos relacionados com adesão celular e crescimento em biofilme são determinantes para o sucesso da infecção e estilo de vida da *X. fastidiosa* (CHATTERJEE *et al.*, 2008).

A partir do sítio de inoculação da bactéria, o processo infeccioso tem início quando as células bacterianas se aderem e passam a se multiplicar nas

paredes dos vasos do xilema, formando os biofilmes que podem, quando suficientemente grandes, obstruir os vasos e bloquear o transporte de água pela planta (ALVES et al., 2009; McELRONE et al., 2003; CHATTERJEE et al., 2008; SUN et al., 2013). Isso demonstra a importância dos processos de adesão e multiplicação bacteriana no desencadeamento de doença

Em plantas susceptíveis, a requeima foliar e a diminuição dos frutos, bem como outros sintomas relacionados com a presença bacteriana aumentam com o tempo, muito provavelmente devido aos efeitos do estresse hídrico causados pelo bloqueio dos vasos do xilema. Além disso, em tecidos sintomáticos é observada uma proporção muito maior de vasos colonizados pela *X. fastidiosa* do que em tecidos assintomáticos, confirmando o pressuposto que os sintomas da doença estão relacionados com a colonização dos vasos do xilema (NEWMAN et al., 2003; NIZA et al., 2015).

O fator de alongamento tu (*EF-Tu*) é uma proteína que desempenha papel central durante a fase de alongamento no processo de síntese de proteínas que ocorre nos ribossomos. Identificado em bactérias e em organelas como mitocôndrias e cloroplastos, o EF-Tu é uma proteína globular que de modo geral é responsável pela seleção e ligação de complexos contendo moléculas de RNA transportador associados a um resíduo de aminoácido, ou aminoacil-RNA_t (aaRNA_t), ao sítio aceptor (sítio A) do ribossomo durante a síntese proteica (RODNINA et al., 2004). Estruturalmente, a proteína Ef-Tu consiste em um único polipeptídeo de 393-396 aminoácidos e cuja estrutura é dividida em 3 domínios globulares, todos envolvidos na ligação com aa-RNA_t (KJELDGAARD & NYBORG, 1992; PALMER et al., 2013). Em bactérias, Ef-Tu é normalmente codificada por 1-3 genes *tuf* (*translation unstable factor*) (LATHE & BORK, 2001; WOLF et al., 1999). No genoma da *X. fastidiosa*, bem como da maioria das bactérias gram-negativas, a proteína Ef-Tu é codificada por 2 cópias separadas de genes, *tufA* e *tufB*, cujos produtos proteicos são idênticos (SIMPSON et al., 2000).

Em condição de crescimento rápido (por exemplo na fase de crescimento exponencial durante a formação de biofilme), foi verificado que EF-Tu representa a proteína mais abundante na maioria das bactérias, atingindo cerca de 10 vezes a concentração dos ribossomos, ou seja, até 700.000 moléculas por célula (FURANO, 1975; PIELAK et al., 2009). Esta abundância que é associada à necessidade de 2

genes para suprir a quantidade de Ef-Tu celular claramente reflete a importância desta proteína no crescimento bacteriano.

Além disso, o Ef-Tu tem sido também relacionado a outras funções importantes para o fitness e patogenicidade, como manutenção da forma/morfologia celular e adesão às células de hospedeiros (SOUFO et al., 2015; GRANATTO et al., 2004). Em *X. fastidiosa*, a proteína Ef-tu foi identificada como altamente expressa em biofilme maduro, e além disso, também foi detectada como proteína abundante na membrana externa da bactéria (*outer membrane*) (SILVA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2016).

O Ef-Tu, além de estar envolvido no crescimento celular e na patogenicidade bacteriana descritos acima, também representa uma molécula importante para a ativação de respostas de defesa de imunidade inata (KUNZE et al., 2004; ZIPFEL, 2006). Em espécies de plantas da família *Brassicaceae* foram identificados receptores de Ef-Tu (*Ef-tu Receptor, EFR*) na superfície das células com a capacidade de reconhecer Ef-Tu como um tipo de molécula que apresenta um perfil molecular associada a patógeno (*pathogen-associated molecular pattern, PAMP*) (KUNZE et al., 2004; ZIPFEL, 2006). Após o reconhecimento de PAMPs como Ef-Tu, uma modificação conformacional é observada nesses receptores de reconhecimento de padrão (*Pattern recognition receptors, PRRs*) que leva à ativação de um conjunto de eventos de sinalização e respostas de defesa denominado imunidade desencadeada por padrão ou PAMP (*Pattern or PAMP-triggered immunity, PTI*) (NURNBERGER et al., 2004; KUNZE et al., 2004; ZIPFEL, 2008). As respostas PTI representam a primeira linha de defesa induzida do sistema de imunidade inata e são capazes de conferir resistência basal não-específica contra a maioria dos microrganismos que tentam invadir as células (JONES & DANGL, 2006; ZIPFEL, 2014).

Nas espécies de *Arabidopsis*, a elicitação de resposta de defesa é naturalmente desencadeada pelo reconhecimento específico de um peptídeo N-acetilado da região N-terminal de Ef-Tu que compreende os 18 primeiros aminoácidos da sequência do peptídeo, denominado elf18. Nestas plantas, o epítipo elf18 é capaz de induzir a ativação de resistência contra infecções subsequentes por bactérias patogênicas através da sinalização mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e etileno (ZIPFEL, 2006). Apesar do peptídeo elicitor elf18 ter sido inicialmente identificado em *Escherichia coli*,

diversas bactérias que apresentam elf18 idêntico ou com pequenas alterações em determinadas regiões na sequência, como elf18 de *Erwynia amylovora* ou de *Agrobacterium tumefaciens*, também apresentaram total atividade elicitora, o que demonstra uma resistência *broad spectrum* e com potencial de ser desencadeada contra uma classe de bactérias que compartilham desse PAMP (KUNZE et al., 2004; BRUTUS & HE, 2010).

Em contraste com o sistema de reconhecimento de flagelina que em plantas é mediado pelo bem estudado e amplamente conservado receptor FLS2 (*Flagellin sensing 2*), alguns PRRs e suas especificidades de reconhecimento de PAMPs são restritos a determinadas famílias ou espécies de plantas (GÓMEZ-GÓMEZ & BOLLER, 2000; SCHWESSINGER & RONALD, 2012; MONAGHAN & ZIPFEL, 2012). Este é o caso de PRRs como Xa21 que possibilita o reconhecimento de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) apenas em espécies selvagens de arroz *Oryza longistaminata* ou mesmo de EFR que apenas foi identificado em membros de *Brassicaceae* (SONG et al., 1995; SONG et al., 1997; KUNZE et al., 2004; ZIPFEL et al., 2006). Apesar de sua restrição taxonômica, PRRs como Xa21 e EFR podem representar forte candidatos para serem utilizados em transferência entre espécies pela capacidade de conferir resistência a uma ampla gama de microrganismos patogênicos (*broad spectrum resistance*) (SCHWESSINGER et al., 2015).

A transferência de Xa21 de arroz para *Citrus* (*C. sinensis*) aumentou moderadamente a resistência contra *Xanthomonas citri*, ao passo que sua transferência para espécies de tomate (*L. esculentum*) e banana (*Musa sp.*) permitiu aumentar fortemente a resistência contra *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*, respectivamente (MENDES et al., 2010; AFROZ et al., 2011; TRIPATHI et al., 2014). Da mesma forma, a transferência de EFR de *Arabidopsis* para espécies de plantas como tomate (*Solanum lycopersicum*) e *Nicotiana benthamiana*, ambas pertencentes a classe *Solanaceae*, conferiu a habilidade de reconhecer elf18 e estas plantas aumentaram a resistência contra diferentes gêneros de bactérias fitopatogênicas, como *Ralstonia* e *Agrobacterium* (LACOMBE et al., 2010).

No Capítulo 1, nós verificamos que o EFR está ausente em espécies de *Citrus* (Fig. 2) e os representantes mais próximos em *C. clementina* (Ciclev 10010968m) e em *C. sinensis* (Cs6g08070) apresentam ainda uma baixa similaridade com EFR (cerca de 45 % de identidade). A ausência de EFR em *Citrus*

justifica a transferência desse receptor para espécies susceptíveis de Citrus, visto que sua funcionalidade pode aumentar a resistência contra patógenos bacterianos que apresentem Ef-Tu capaz de ser reconhecido como PAMP. A transferência do sistema de percepção de PAMP mediada por EFR foi bem-sucedida até mesmo quando as espécies-alvo foram monocotiledôneas. A expressão de *EFR* em plantas de arroz fez com que estas plantas passassem a reconhecer elf18 de *E. coli* e de *Xoo* como moléculas elicitoras e as plantas aumentaram a resistência contra isolados de *Xoo* e *Acidovax avenae* (SCHWESSEINGER et al., 2015; LU et al., 2015). Da mesma forma, a transferência de EFR de *Arabidopsis* para trigo (*Triticum aestivum*) também conferiu aumento de resistência nas plantas transgênicas contra *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* (SCHOONBEEK et al., 2015). Estes resultados sugerem que pelo menos parte do mecanismo de sinalização das respostas PTI é compartilhado entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Além disso, os resultados demonstram a aplicabilidade da transferência de EFR, Xa21 e potencialmente outros PRRs entre as espécies de plantas como uma forte estratégia para o aumento de resistência em espécies de plantas cultivadas.

A transferência de um sistema de reconhecimento de PAMPs entre as famílias de plantas pode significar uma estratégia promissora visando resistência a um maior número de patógenos e, embora a importância dos PRRs na imunidade das plantas já tenha sido demonstrada, trata-se de uma alternativa ainda muito pouco explorada entre as espécies de plantas cultivadas. Assim, considerando que in vitro o peptídeo sintético elf18 de *X. fastidiosa* foi capaz de desencadear atividade elicitora em *Arabidopsis* (KUNZE et al., 2004) neste trabalho nós avaliamos o papel do EFR no reconhecimento de *X. fastidiosa* a partir da transferência de EFR de *Arabidopsis* para plantas-modelo de *N. tabacum* bem como a partir de linhagens mutantes de *Arabidopsis efr1-*.

Arabidopsis thaliana e *Nicotiana tabacum* foram utilizadas nesse trabalho como plantas-modelo para o estudo funcional do EFR nas interações com *X. fastidiosa*. Em uma primeira etapa do trabalho, foram utilizadas linhagens homozigotas de *Arabidopsis thaliana* que apresentam inserção de T-DNA no *locus* AT5g20480 relacionado com a síntese de EFR. Por estas plantas mutantes apresentarem *EFR* com expressão silenciada, elas são completamente insensíveis ao epítopo elf18 de Ef-Tu e foram utilizadas como fonte de estudo para avaliar o papel deste receptor em interação com *X. fastidiosa*. Em uma segunda etapa, o

papel do receptor foi avaliado a partir da superexpressão do *AtEFR* em *Nicotiana tabacum*, visto que as plantas selvagens não apresentam *EFR* expresso nas células e constituem um bom modelo para o estudo envolvendo interação com a *X. fastidiosa*, inclusive apresentando sintomas bem definidos quando as plantas são inoculadas com a bactéria.

2. HIPÓTESES

- A ausência do receptor de Ef-tu (EFR) em plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* pode prejudicar o reconhecimento e defesa da planta contra microrganismos bacterianos. Bactérias como a *Xylella fastidiosa* que superexpressam a proteína Ef-Tu durante crescimento em biofilme podem se beneficiar da ausência de EFR nas células vegetais e aumentar a sua população, bem como a colonização dos vasos do xilema.
- A transferência de EFR para *Nicotiana tabacum* pode contribuir para que estas plantas passem a reconhecer proteínas Ef-Tu de microrganismos bacterianos como PAMPs e ativem respostas de imunidade inata. Considerando que *in vitro* elf18 sintético de *X. fastidiosa* foi capaz conferir atividade elicitora em *Arabidopsis thaliana*, a transferência do receptor EFR de *A. thaliana* para *N. tabacum* possibilita que as plantas transgênicas passem a desencadear as respostas de defesa PTI contra *X. fastidiosa* pelo reconhecimento de elf18 como molécula elicitora.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o papel do receptor EFR no reconhecimento de PAMP de *X. fastidiosa* e desencadeamento de resposta de imunidade inata.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Arabidopsis como planta-modelo

- Obter plantas de *Arabidopsis thaliana* com o gene *EFR* silenciado em homozigose.
- Desafiar as plantas mutantes de *A. thaliana* com *X. fastidiosa* linhagem 11399-GFP.
- Quantificar a população de *X. fastidiosa* em *A. thaliana* mutantes e selvagens por qRT-PCR.
- Analisar a colonização da bactéria *X. fastidiosa* nos vasos do xilema de *A. thaliana* mutantes e selvagens por microscopia de fluorescência,
- Identificar alterações morfológicas associados com sintomas em *A. thaliana* pela interação com *X. fastidiosa* nos tecidos.

3.2.2. Tabaco como planta-modelo

- Transformar plantas de *N. tabacum* variedade RP-1 com construção gênica contendo 35S::EFR-GFP-His.
- Selecionar e validar os transformantes de *N. tabacum* por PCR convencional.
- Quantificar a expressão do transgene EFR em *N. tabacum* por RT-qPCR.
- Avaliar a expressão da proteína recombinante nos transformantes de *N. tabacum* por Western blot.
- Verificar a funcionalidade do receptor EFR através da quantificação de ROS nos tecidos foliares dos eventos transgênicos de *N. tabacum* pela atividade elicitora de elf18 de *E. coli*.
- Avaliar o reconhecimento de elf18 de *X. fastidiosa* nos tecidos foliares dos eventos transgênicos de *N. tabacum* através da quantificação de ROS.
- Desafiar os eventos transgênicos e selvagens de *N. tabacum* com *X. fastidiosa* e avaliar a incidência e severidade de sintomas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Arabidopsis thaliana* mutantes para EFR

Foram utilizados neste experimento indivíduos de *A. thaliana* ecótipo Columbia 0 (col-0) apresentando o gene *EFR* silenciado por inserção de T-DNA. As sementes foram obtidas da coleção de mutantes pertencentes ao ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*) (YAMADA et al., 2003) o qual está integrado ao banco TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*, disponível em <http://www.arabidopsis.org>). A referência da linhagem mutante na coleção é *SALK_044334* e o silenciamento de expressão foi obtido pela inserção de T-DNA em região de éxon no *locus* AT5G20480 que codifica *EFR*.

As sementes adquiridas foram inicialmente esterilizadas com etanol 70% (v/v) por 5 minutos, hipoclorito de sódio 40% (m/v) por 20 minutos e seguido de quatro lavagens em água MilliQ estéril. A germinação e o desenvolvimento inicial foram realizados *in vitro* a partir de meio de cultura MS/2 sólido acrescido de 4,4 ml/L de tampão MES 3mM pH 5,7 e ajustado a 0,3% (m/v) de glicose e 0,55% (m/v) de ágar (MURASHIGUE & SKOOG, 1962). Para a quebra de dormência das sementes, as placas foram mantidas durante 72-96 horas no escuro a 4°C e com adição de 50 mg/L do antibiótico canamicina no meio para seleção dos indivíduos mutantes na população (ALONSO et al., 2003).

As plântulas germinadas *in vitro* foram transplantadas para vasos contendo substrato Plantmax HT® e vermiculita na proporção 2:1, respectivamente. As plantas transplantadas foram cultivadas sob fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de escuro e temperatura constante de 22°C em estufas *Convion*. Sementes de *A. thaliana col-0* selvagens foram também germinadas e crescidas seguindo as mesmas condições, com exceção do uso de canamicina no meio. Estas plantas foram consideradas como parte do grupo controle, ou testemunha, nas avaliações que se seguiram.

4.2. Seleção de *Arabidopsis thaliana efr-1* em homozigose

Inicialmente, as sementes de *Arabidopsis thaliana* col-0 mutantes contendo gene *EFR* silenciado (lócus At5g20480) foram esterilizadas e introduzidas em meio MS contendo antibiótico canamicina (50 µg/mL) para seleção dos indivíduos mutantes, conforme descrito no item 4.1 (Material e Métodos). Embora algumas sementes tenham germinado, nenhuma apresentou crescimento efetivo em placas de Pétri e, dessa forma, outro conjunto de sementes do mesmo lote foi utilizado para germinação e crescimento, porém diretamente em substrato enriquecido com vermiculita em proporção 2:1, respectivamente, e sem adição de agente seletivo (antibiótico canamicina).

Amostras foliares de plantas individualizadas foram destacadas e utilizadas em processo de extração de DNA (DOYLE & DOYLE, 1990). Foram realizadas PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers* específicos) referentes ao vetor de inserção de T-DNA (*BP*, utilizando-se *LBb1.3*) e ao lócus do gene *EFR* (*LP* e *RP*). Os *primers* utilizados foram desenhados a partir de ferramenta específica de validação de mutantes presente no site do SALK (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Reações de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) foram realizadas utilizando os produtos de PCR e, a partir do padrão de bandamento observado, os indivíduos foram avaliados quanto à inserção do T-DNA no genoma.

4.3. Condições experimentais da interação entre *X. fastidiosa* e *A. thaliana*

O experimento que visou avaliar a interação entre *X. fastidiosa* e *A. thaliana* foi conduzido utilizando-se a linhagem 11399-GFP de *X. fastidiosa* para inocular *A. thaliana* selvagens (*Wild type*, *WT*) e mutantes para o gene *EFR* (*efr-1*). Cada linhagem bacteriana foi inoculada em 45 indivíduos mutantes *efr-1* e em 45 plantas *WT*. Um grupo de 15 plantas de cada genótipo (*WT* e *efr-1*) foi também inoculado utilizando tampão salino-fosfato (PBS) e estas formaram o tratamento que por vezes foram referidas aqui como *mock*.

A solução de inóculo utilizada foi preparada a partir da ressuspensão de bactéria (crescida em meio PWG) em solução tampão PBS (DAVIS et al., 1981). As soluções de inóculo foram padronizadas em densidade óptica ao redor de 0,5 a

partir de leituras de absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda fixado em 600 nm.

O processo de inoculação das plantas foi realizado a partir de 2 µL da solução de inóculo ou do tampão PBS, sendo aplicada diretamente sobre região da nervura central próxima ao pecíolo de 3 folhas da base da roseta. Em seguida, foram feitos furos no local da inoculação com auxílio de agulha de pequena espessura para facilitar a entrada da bactéria nos tecidos (ROGER, 2012). As coletas foram realizadas em 5 e 15 dias após a inoculação (DAI) em cada tratamento. Foram utilizadas nas avaliações 15 plantas de cada tratamento em cada tempo de coleta.

4.4. Quantificação de *X. fastidiosa* nos tecidos de *A. thaliana*

As folhas, juntamente com os pecíolos das plantas inoculadas, foram coletadas e, após serem maceradas em nitrogênio líquido, tiveram o DNA total extraído para quantificação da população bacteriana nos tecidos. O DNA foi extraído a partir de método que utiliza tampão a base de detergente surfactante CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), conforme Doyle & Doyle (1990).

O DNA total extraído dos tecidos foliares foi então utilizado como *template* para a quantificação da população bacteriana por qRT-PCR, conforme Oliveira et al (2002). A detecção da população bacteriana foi conduzida em aparelho termociclador (*Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System*) e duas réplicas foram analisadas para cada uma das repetições biológicas de cada tratamento. A partir dos valores de *ct* obtidos com *threshold* normalizado e, considerando a equação da curva de crescimento de *Xylella fastidiosa*, foi possível determinar a quantidade de bactéria presente nas amostras analisadas.

4.5. Avaliação de sintomas em *A. thaliana* inoculadas com *X. fastidiosa*

As plantas de *A. thaliana* inoculadas com *X. fastidiosa* foram avaliadas quanto ao surgimento de alterações fenotípicas que pudessem estar associadas a efeitos sintomáticos da presença da bactéria. Como não existe sintoma ainda caracterizado em *Arabidopsis* pela interação com *X. fastidiosa*, neste trabalho

qualquer alteração verificada nas plantas que pudesse estar associada com a bactéria foi avaliada. E de modo geral, as alterações associadas com a infecção bacteriana em *Arabidopsis* foram: murcha, despigmentação, pontos cloróticos e arroxamento e alguns sinais de necrose, principalmente nas folhas da roseta.

Como as alterações mencionadas são também efeitos típicos de senescência natural das plantas, as avaliações foram quantificadas inclusive nas plantas inoculadas com tampão salino-fosfato (PBS), considerando que a bactéria poderia atuar retardando ou adiantando estes efeitos. A incidência de plantas sintomáticas foi verificada a partir da média entre a frequência de plantas sintomáticas por tratamento determinada por 3 avaliadores em 5, 15 e 25 DAI.

4.6. Superexpressão de *EFR* em *Nicotiana tabacum*

4.6.1. O Vetor *pEarley gate 103* e a construção *35S::EFR-GFP-His*

Para transformação genética de *Nicotiana tabacum*, foi utilizada a linhagem GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* contendo o vetor *pEarley Gate 103* que é compatível e bastante utilizado na transformação de plantas.

O vetor utilizado apresenta na construção o promotor constitutivo *CaMV 35S* que regula a atividade transcricional de *EFR*, que por sua vez está fusionado com sequências que codificam para a proteína GFP e o polipeptídeo histidina 6xHis (*35S::EFR-GFP-His*).

Entre as bordas direita e esquerda do T-DNA encontra-se também o terminador do gene *OCS* (*octopina sintase*) e a sequência que codifica para uma fosfinotricina acetiltransferase que confere resistência à fosfinotricina (*BipR*). Fora das bordas direita e esquerda do T-DNA está presente, entre outros, o gene *KanR* que codifica para a enzima amino glicosídeo fosfotransferase e que confere resistência ao antibiótico canamicina (Figura 2).

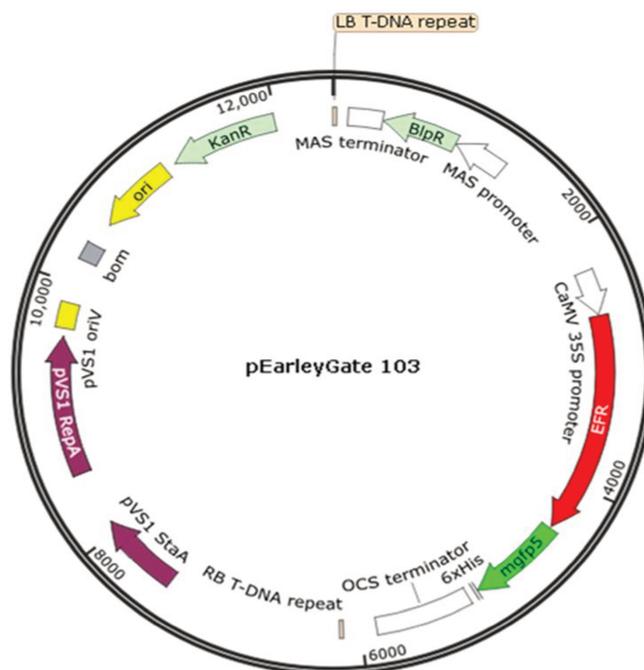


Figura 2 - Esquema do vetor *pEarley gate 103* utilizado no processo de transformação genética de *Nicotiana tabacum*. Em vermelho está em destaque o gene *EFR* isolado de *A. thaliana* e que está fusionado à sequência do gene *GFP* de membrana (*mgfp*) e a 6 resíduos de Histidina (6xHis). O promotor constitutivo 35 S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S) regula a atividade transcricional e a região terminadora do gene octopina sintase (OCS) é utilizada no vetor como um terminador transcricional na construção.

4.6.2. Obtenção do inóculo com *Agrobacterium tumefaciens*

A solução de inóculo utilizada no processo de transformação genética de *Nicotiana tabacum* deste trabalho foi obtida da seguinte forma: no dia anterior ao processo de infecção dos discos foliares, colônias individualizadas crescidas em meio de cultura YEP ou LB sólidos (acrescido de canamicina 100 µg/mL, rifampicina 100 µg/mL e gentamicina 50 µg/mL) foram introduzidas em 5 mL de meio líquido YEP contendo os mesmos antibióticos de seleção do meio sólido (canamicina 100 µg/mL, rifampicina 100 µg/mL e gentamicina 50 µg/mL). Os recipientes estéreis contendo o pré-inóculo foram colocados em agitador (*shaker*) e mantidos em temperatura de 28 °C e lenta agitação (180 rpm) para o crescimento bacteriano.

No dia seguinte, após cerca de 16 horas de crescimento, o pré-inóculo crescido foi introduzido em *erlenmeyer* estéril contendo 45 mL do mesmo meio YEP utilizado para o crescimento do pré-inóculo. O *erlenmeyer* foi novamente mantido em

agitador sob lenta agitação (180 rpm) a 28 °C e o crescimento da cultura bacteriana foi monitorado a partir de leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda fixado em 600 nm, até que se observasse uma absorbância de 0,5 ou uma leitura próxima a este valor.

No momento que fosse detectada a absorbância pretendida, a cultura era transferida para tubos *Falcon* 50 mL e centrifugadas a 7500 rpm por 15 minutos em temperatura de 10 °C para que as células bacterianas fossem precipitadas da solução. O pellet contendo as células bacterianas eram então ressuspensas em meio MS líquido acrescido de BAP (1 mg/L) e essa solução contendo as células bacterianas em meio MS líquido foi utilizada diretamente na infecção dos discos foliares durante o processo de transformação genética das células do tabaco.

4.6.3. Etapas do processo de transformação genética

No processo de transformação genética, foram utilizados tecidos foliares da variedade RP-1 de *Nicotiana tabacum* (tabaco). Inicialmente, sementes de tabaco foram desinfestadas a partir de lavagens com solução de hipoclorito 10 % (v/v) por 3 minutos, seguido de lavagem com etanol 70 % (v/v) por 5 minutos e por fim as sementes foram lavadas em água destilada autoclavada por 4-5 vezes para retirar o excesso de impureza, como resíduos das sementes e das soluções de lavagens empregadas no processo de desinfecção.

As sementes de tabaco desinfestadas foram então introduzidas em meio MS/2 e acondicionadas em sala de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 16 horas até que se observasse o desenvolvimento de limbo foliar expandido o suficiente para que fosse utilizado no processo de transformação genética.

Após o crescimento das plântulas, discos foliares foram cortados dos limbos desenvolvidos com auxílio de pinça, bisturi e ponteiros de micropipetas e transferidos para placas de Pétri contendo meio MS sólido acrescido de BAP (1mg/L), designados aqui como meios de co-cultivo. Os discos foliares dispostos com face adaxial para cima foram infectados com 20 µL de solução de inóculo contendo a *A. tumefaciens* e o vetor que apresenta a construção 35S::EFR-GFP-His.

As placas de co-cultivo contendo os discos foliares de tabaco infectados foram mantidas em 24 °C por 2 dias em ausência de luz para favorecer a agro-infecção. Após esse período, os discos foram transferidos para placas contendo

meio MS acrescido de 1 µg/mL de BAP, 100 µg/mL de cefotaxima e 2 µg/mL de fosfinotricina para seleção dos transformantes no meio (meios de seleção). Essas placas foram transferidas para ambiente com fotoperíodo de 16 horas e a cada 7-10 dias os discos eram transferidos para novos meios de seleção contendo os mesmos agentes seletivos (1 µg/mL de BAP, 250 µg/mL de cefotaxima e 2 µg/mL de fosfinotricina).

Durante o processo de transformação, algumas placas contendo discos foliares em meio de co-cultivo não foram infectados com *A. tumefaciens* e serviram como controle positivo para os agentes seletivos (antibióticos e herbicidas) e as plantas regeneradas nos meios sem agentes seletivos serviram como controle negativo para todas as demais análises *in vitro* e *in vivo*.

4.6.4. Seleção e confirmação de transformantes de *Nicotiana tabacum*

A partir do surgimento de brotações nos discos foliares, os brotos foram recortados e individualizados em placas contendo meio MS acrescido dos mesmos agentes seletivos. Os brotos que apresentaram maior vigor foram transferidos para meio de enraizamento (MS/2 contendo 250 µg/mL e 2 µg/mL de fosfinotricina) e neste foram mantidos até o surgimento de raízes. As plântulas foram então transferidas para vasos contendo substrato e mantidas sob aclimação por 3-4 semanas ou até que se observasse o desenvolvimento de folhas em tamanho suficiente para serem coletadas.

As folhas coletadas tiveram o DNA extraído (DOYLE & DOYLE, 1990) e foram realizadas reações de PCR convencional utilizando conjuntos de *primers* específicos para anelamento em região promotora *35S* do vetor (*Forward Primer*) e em região específica do gene de interesse *EFR* (*Reverse Primer*). Após reações de eletroforese em géis de agarose 1% utilizando os produtos de PCR, os indivíduos foram avaliados quanto a inserção do transgene de acordo com a presença ou ausência do fragmento de 2500 pares de bases (pb) referente ao tamanho do *amplicon* esperado nas reações PCR. A presença do fragmento de interesse permitiu então confirmar os eventos transformantes de *N. tabacum* que apresentam o transgene 35S::EFR-GFP-His inserido no genoma.

4.6.5. Expressão do transgene *EFR*

As plantas de *N. tabacum* que foram selecionadas por PCR convencional como positivas quanto a presença do transgene *EFR* tiveram a expressão deste quantificada a partir de análises por qRT-PCR.

Amostras de folhas foram coletadas e tiveram o RNA total isolado a partir de reagente *Trizol* (*TRIzol® Reagent, Invitrogen*), conforme recomendado pelo fabricante. Após ressuspensão do pellet com água MilliQ livre de RNase, as amostras de RNA foram purificadas em colunas e tratadas com enzima DNase para eliminar resíduos de DNA da amostra.

A qualidade do RNA total isolado dos tecidos foi avaliada a partir de reações de eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v). As amostras que apresentavam uma boa qualidade verificada nas imagens dos géis foram selecionadas e quantificadas em aparelho *nanodrop* (*Thermo Scientific*). Após padronização das concentrações de RNA, 1µg deste foi utilizado para síntese do cDNA em aparelho termociclador e utilizando kit *SuperScript® Double-Stranded cDNA Synthesis* (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante.

Após a síntese de cDNA, as amostras foram diluídas 50 X (1:49) e as alíquotas diluídas foram utilizadas diretamente nas reações por qRT-PCR. Para as análises de expressão gênica foi utilizado o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (*Promega*) e o gene *ARPC3* (*Actin-related protein C3*) de tabaco foi utilizado nas análises como gene de referência nas reações de qRT-PCR.

4.6.6. Detecção da proteína recombinante EFR-GFP-His

Folhas de plantas transgênicas e selvagens (não transformadas) foram coletadas para extração de proteínas totais. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e o extrato obtido foi homogeneizado em solução tamponante contendo 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1 mM EDTA; 0.01 M KCl; PVP-40; 0.1% (v/v) 2-mercaptoetanol; BSA 2 mg/mL e PMSF 1mM. Após agitação em aparelho *vórtex*, o material homogeneizado foi mantido em gelo por uma hora antes de ser centrifugado a 15.000 g por 15 minutos a 4 °C. A solução sobrenadante foi então coletada e a determinação das proteínas totais foi estimada a partir do método de Bradford (1976) e utilizando-se equação de curva-padrão de albumina sérica bovina (BSA). Os valores de absorbância das amostras e das soluções da curva padrão de BSA

foram medidos em aparelho *Varioskan Flash multireader* (Thermo Scientific) em comprimento de onda 595 nm.

A quantificação de proteínas permitiu a padronização das amostras e estas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante em presença de SDS (SDS-PAGE) para a separação das proteínas totais de acordo com seus pesos moleculares (LAEMMLI, 1970). Após separação, as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose por *western blot* via sistema de transferência semi-seco em aparelho *Multiphor II* associado a kit de transferência *NovaBlot* (GE Healthcare). A separação de proteínas por SDS-PAGE ocorreu ao mesmo tempo em dois géis (duplicata) e enquanto um destes foi utilizado para transferência via *western blot*, o outro gel foi corado em solução de *Coomassie blue* para observação e comparação do perfil de separação das proteínas totais no gel desnaturante.

Após a separação e transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, esta foi submetida a reação de *imunoblotting*. Por esse método, as membranas contendo as proteínas totais aderidas foram inicialmente bloqueadas com solução tampão salino-fosfato contendo tween-20 (TBS) e BSA. Após o bloqueio, foi adicionado solução contendo anticorpo primário (anti-gfp produzido em fração IgG de coelho) e a solução foi mantida em contato com a membrana por 15 minutos.

Após esse período, as membranas foram lavadas por 4 vezes em TBS e foi adicionado solução contendo o anticorpo secundário anti-rabbit conjugado a enzima peroxidase. Novamente a membrana foi lavada em solução TBS e foi adicionado solução contendo reagente para detecção do produto da reação da enzima peroxidase (*ECL Western Blotting Detection Reagent, G.E Healthcare Life Sciences*). Logo em seguida a detecção da reação foi verificada por método de quimioluminescência em filme fotográfico. O processo de *imunoblotting* foi realizado em aparelho *SNAP i.d 2.0 protein detection* (Life Science).

4.7. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS)

4.7.1. Método de quimioluminescência

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi quantificada nos tecidos a partir de discos foliares que foram recortados e transferidos para placas de

96 poços. Aos poços contendo os discos foliares foi adicionado 150 µL de água MilliQ autoclavada e as placas foram mantidas sob luz *overnight*.

Após esse período, a água foi retirada e aos poços foi adicionada solução contendo 17mg/ml de *luminol* (*Sigma*), 10 mg/ml de enzima “*horseradich peroxidase* (*HRP*) ” e solução de peptídeo elf18 ou de uma suspensão bacteriana que se pretendia avaliar a atividade elicitora (ROUX et al, 2011).

Uma solução contendo os mesmos reagentes, porém trocando o peptídeo ou solução elicitora por água, foi utilizada para normalização da emissão de luminescência (controle negativo). A luminescência emitida nas reações foi detectada e analisada em aparelho *Varioskan® Flash Multimode Reader* (*Thermo Scientific*).

4.7.2. Método histoquímico

A quantificação de ROS nos tecidos das plantas foi também avaliada conforme Thordal-Christensen et al. (2003). Por este método, a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos tecidos foi detectada através de reação específica com 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Folhas em similar fase de desenvolvimento foram destacadas e transferidas para tubos contendo solução ácida (pH próximo a 3) de DAB 1,0 mg/mL. A solução de DAB foi infiltrada à vácuo nos tecidos e as folhas imersas em solução com DAB foram incubadas por 6-8 horas no escuro. Os tecidos foram descorados a partir de lavagens em etanol: ácido acético (3:1) a 95°C por 15 minutos. A produção de ROS nos tecidos foliares foi avaliada em microscópio estereoscópio a partir da intensidade de áreas da folha coradas em marrom.

4.8. Avaliação de sintomas nas plantas selvagens e transgênicas de *Nicotiana tabacum* superexpressando *EFR*

As plantas selvagens e transgênicas de *N. tabacum* superexpressando *EFR* (geração F1) foram transferidas para casa de vegetação e após 2-3 semanas foram utilizadas em experimento para avaliação de sintomas em decorrência da presença de *X. fastidiosa* nos tecidos.

Um total de 20 plantas selvagens e 57 plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene *EFR* foram dispostas aleatoriamente sobre as bancadas da casa de vegetação do Centro de Citros Sylvio Moreira que apresenta condições controladas de irrigação e ventilação, além de atender todas as exigências estabelecidas pela CTNBio para os estudos com organismos geneticamente modificados (OGMs). Para este experimento, foram utilizados 5 eventos de plantas transgênicas de tabaco, denominados T1, T2, T3, T4 e T5. Por apresentarem taxas diferentes de germinação ou devido a perdas associadas ao processo de seleção nos meios de cultura, aclimatação e transferência para casa de vegetação, foram utilizados números variados de indivíduos para cada evento de transformação utilizado no experimento.

Para a inoculação das plantas, foi utilizada uma solução contendo *X. fastidiosa* linhagem 9a5c ressuspensa em tampão salino-fosfato (PBS) e cuja densidade óptica (D.O.) foi ajustada para 0,7 através de leituras em espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado em 600 nm. A suspensão bacteriana foi obtida através da “raspagem” de colônias de *X. fastidiosa* previamente crescidas por 6 dias a 28 °C em placas de Petri contendo meio PWG. Dez microlitros (10 µL) da suspensão bacteriana foram utilizados sobre a base do pecíolo de uma das folhas basais das plantas de tabaco para a inoculação das plantas e logo após foram feitos de 4-5 furos na mesma região para facilitar a entrada da bactéria nos tecidos das plantas (ALMEIDA et al., 2001). Um grupo de 5 plantas selvagens e 5 transgênicas foram também inoculadas seguindo as mesmas condições, porém utilizando tampão PBS ao invés de suspensão bacteriana. Esse grupo de plantas foi utilizado como controle na avaliação dos sintomas das plantas inoculadas com *X. fastidiosa*.

Após 30 dias de inoculação, a primeira folha próxima ao ponto de inoculação foi coletada para extração de DNA e posterior PCR de diagnóstico para confirmar a eficiência de inoculação. Apenas as plantas positivas foram mantidas no experimento, além das plantas inoculadas com tampão PBS.

Após a inoculação, todas as plantas tiveram suas folhas enumeradas a partir do ponto de inoculação em ordem crescente segundo a inserção de seus pecíolos no caule. Os sintomas foram avaliados nas folhas a partir do surgimento de clorose e lesões pequenas e escuras de coloração alaranjada nas folhas que são típicas da presença da bactéria nos tecidos (LOPES et al., 2000). A partir da

manifestação de sintomas nas plantas, as avaliações foram feitas em cada planta por 3 diferentes avaliadores. Os sintomas foram avaliados nas plantas a partir da determinação de severidade e incidência de sintomas.

Inicialmente todas as folhas de todas as plantas foram enumeradas e a avaliação da severidade dos sintomas foi feita para cada folha a partir da atribuição de notas conforme escala diagramática de severidade de sintomas definida com base na relação do percentual de área foliar com lesões típicas da presença bacteriana (PEREIRA, 2015). A incidência de sintomas foi avaliada a partir da determinação do número de folhas sintomáticas observadas em relação ao número de folhas totais.

A partir da severidade e incidência de sintomas, foi determinado também a curva de progresso da doença, mais especificamente foi avaliada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em cada evento de transformação e também nas plantas selvagens não transformadas. A determinação de AACPD é uma estratégia interessante em estudos de interação planta-patógeno e permite representar os danos causados por patógenos ao longo do período de infecção (BERGAMIN FILHO, 1995). Para isso, inicialmente as médias das notas de severidade ou incidência que foram verificadas em cada tratamento e em cada tempo de avaliação foram transformadas em gráficos de linha. A partir da soma das áreas em cada intervalo de avaliação (áreas de trapézios) foi obtido o AACPD e a partir desses resultados foi determinado também o percentual de redução de doença em cada evento de transformação pela comparação dos valores verificados nas plantas selvagens. Análises estatísticas tanto para a incidência quanto severidade de sintomas foram realizadas utilizando a comparação de médias por teste t e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ ou altamente significativas quando $p < 0,01$.

5. RESULTADOS

5.1. Seleção de homozigotos em mutantes *efr-1* de *A. thaliana*

A seleção dos indivíduos que apresentam gene *EFR* silenciado em homozigose foi realizada a partir de reações de PCR convencional utilizando primers *Lb1.3*, *LP* e *RP*, conforme descrito no item 4.2.

Segundo consulta no site do SALK, o tamanho do produto esperado em caso de plantas selvagens (*wild type*, *WT*) é de uma única banda de 1088 pb que corresponde ao fragmento inteiro gerado entre *LP* e *RP* (sem inserção de T-DNA em ambos os cromossomos). Em caso de plantas heterozigotas, espera-se um fragmento de 231-531 pb relativo à inserção do T-DNA em um dos cromossomos, além do fragmento de 1088 pb que representa o outro cromossomo onde o T-DNA não foi inserido. Em linhagens homozigotas, por sua vez, espera-se a visualização de apenas um fragmento entre 231-531 pb.

Pela análise dos fragmentos no gel, nenhum dos indivíduos testados apresentava *EFR* silenciado em homozigose (Figura 3), ou seja, em nenhum caso observou-se a banda única de 231 a 531 pb.

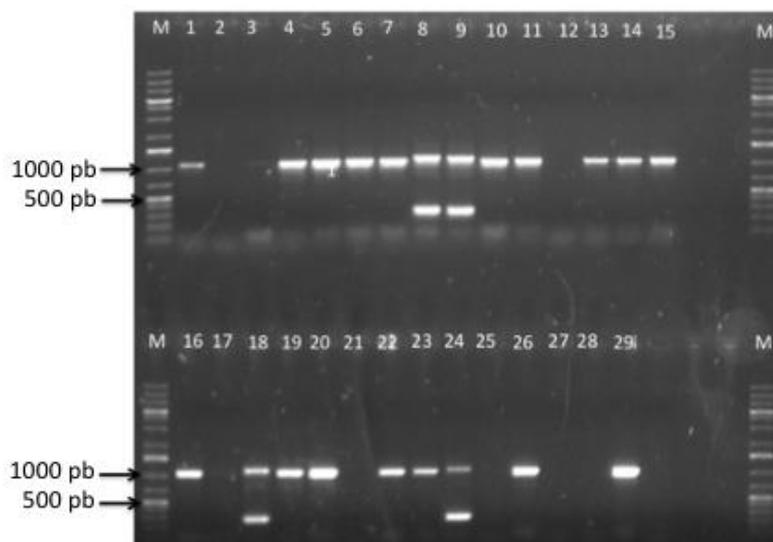


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) para identificar os indivíduos de *A. thaliana* col-0 com *EFR* silenciado em homozigose. As setas superior e inferior de cada gel destacam a altura dos fragmentos de 1000 e 500 pb, respectivamente, conforme o marcador de peso molecular (M). O fragmento amplificado de 1088 pb sugere ausência de T-DNA inserido no genoma, ou seja, a presença de apenas esse fragmento representa indivíduo selvagem. O fragmento menor de cerca de 350 pb caracteriza a inserção de T-DNA no genoma. Indivíduos mutantes homozigotos apresentam apenas o fragmento de ~350 pb e os heterozigotos apresentam ambos os fragmentos de 350 pb e 1088 pb. No gel, M é referente ao Marcador de peso molecular (*GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder, Fermentas TM*) e os números representam os produtos de PCR das amostras avaliadas.

Dessa forma, considerando a ausência de homozigotos na população, foram selecionados alguns indivíduos heterozigotos (amostras 8, 9, 18 e 24) para que fossem recuperadas as sementes oriundas de autofecundação. Estas sementes foram novamente germinadas de modo a selecionar os mutantes homozigotos para *EFR* na geração seguinte. Estes indivíduos se desenvolveram em substrato enriquecido com vermiculita e, após 2-3 semanas de crescimento, tecidos foliares foram novamente destacados e utilizados em processo de extração de DNA para confirmação dos mutantes homozigotos pela inserção de *T-DNA* na população por PCR utilizando os mesmos *primers* citados acima (Figura 4).



Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) para identificar os indivíduos de *A. thaliana* col-0 com *EFR* silenciado em homozigose. O fragmento de 1088 pb amplificado e apontado no gel sugere ausência de T-DNA inserido no genoma, ou seja, a presença de apenas esse fragmento representa indivíduo selvagem. O fragmento menor de cerca de 350 pb é também apontado por uma seta e caracteriza a inserção de T-DNA no genoma. Indivíduos mutantes homozigotos apresentam apenas o fragmento de ~350 pb e os heterozigotos apresentam ambos os fragmentos de 350 pb e 1088 pb. No gel, M é referente ao Marcador de peso molecular (*GeneRuller 1Kb Plus DNA Ladder, Fermentas TM*) e os números representam os produtos de PCR das amostras avaliadas. Os números dos poços representam os indivíduos de *Arabidopsis* avaliados.

O padrão de bandeamento característico esperado é o mesmo daquele abordado na Figura 3 para caracterizar as plantas selvagens ou mutantes por inserção de *T-DNA* do tipo heterozigotas ou homozigotas. Pela análise do gel, embora o marcador de peso molecular não esteja evidenciado, é visível o mesmo padrão de bandas da figura anterior, porém neste caso são observadas amostras onde apenas o fragmento “menor” é evidenciado, e que representam os indivíduos homozigotos na população avaliada. Assim, os indivíduos representados no gel pelos números 3, 5, 16, 19 e 21 foram considerados homozigotos. Novamente foi realizada a autofecundação destas plantas para que fossem obtidas apenas sementes cujos indivíduos apresentem *EFR* silenciado em homozigose. Estas sementes foram armazenadas e parte destas foi utilizada em experimento de infecção com a bactéria *Xylella fastidiosa*.

5.2. Quantificação de *X. fastidiosa* nos tecidos de *A. thaliana* por qRT-PCR

Indivíduos de *Arabidopsis thaliana* Columbia -0 contendo o gene *EFR* silenciado em homozigose (*efr-1*) foram selecionados, propagados e utilizados em experimento para infecção com a bactéria *Xylella fastidiosa*. Após cerca de 20 dias de crescimento, plantas *efr-1* e WT foram selecionadas e infectadas com a bactéria *Xylella fastidiosa* linhagem 11399 e que anteriormente foi transformada com gene que codifica para a proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*).

A bactéria foi cultivada em meio PWG (DAVIS et al., 1981) sólido por um período de 7 dias em 28 °C e, após esse período, foi novamente repicada em placas contendo meio PWG. As colônias de bactérias recuperadas foram ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS) e o inóculo foi utilizado com O.D igual a 0,5 medido em aparelho espectrofotômetro de luz visível com comprimento de onda fixado em 600 nm. Antes de utilizar a solução do inóculo para infectar as plantas, uma parte desta foi diluída serialmente (de 10^{-1} a 10^{-7}) e aplicadas em placas contendo meio PWG sólido (2 réplicas por fração de diluição) para posterior quantificação das unidades formadoras de colônia (UFC).

Após o processo de inoculação, o sucesso da infecção bacteriana nos tecidos das plantas, bem como o acompanhamento do crescimento populacional de *X. fastidiosa*, foi realizado a partir de análises de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando *primers* e sonda de hibridização específicos para detecção de *X. fastidiosa* pelo sistema *TaqMan*. Inicialmente, foi gerada uma curva-padrão de crescimento bacteriano utilizando-se concentrações conhecidas da bactéria diluídas em solução de DNA de *A. thaliana* não inoculadas e valores de UFC obtidas a partir do crescimento de colônias da bactéria em diluição seriada. Análises por qRT-PCR utilizando *primers* específicos para detecção de *X. fastidiosa* permitiram correlacionar os valores de *ct* com a quantidade de células bacterianas presentes nas amostras de DNA da mistura (Figura 5).

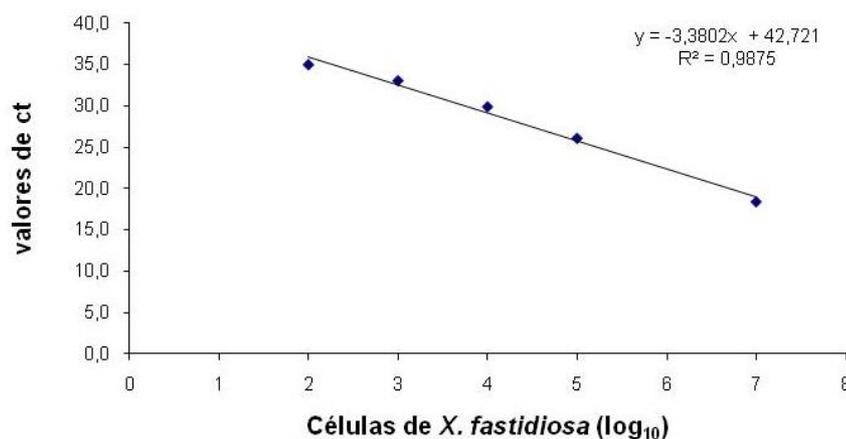


Figura 5 – Curva-padrão relacionando os valores de ct (qRT-PCR) com a quantidade de células de *X. fastidiosa* nas amostras de DNA de *A. thaliana*. A curva-padrão foi determinada a partir de concentrações conhecidas de suspensão bacteriana e as leituras foram feitas em *7500 Fast Real Time PCR System (Thermo Scientific)*.

A correlação dos valores de ct com a quantidade de células bacterianas permitiu, a partir de análise de regressão linear, obter a equação da curva-padrão que foi utilizada para quantificar a população de *X. fastidiosa* nos tecidos foliares de *A. thaliana*. No gráfico podemos observar que o coeficiente de determinação de regressão (R^2) da equação apresenta um valor próximo a 0,99, o que reflete a linearidade da curva (como os pontos se ajustam na curva), ou seja, em quase 99 % das vezes a variação do número de células de *X. fastidiosa* é explicada pela variação dos valores de ct.

A quantidade de bactéria presente nas amostras de DNA de *A. thaliana* foi determinada a partir da substituição dos valores de ct obtidos com *threshold* normalizado na equação da curva-padrão de crescimento de *X. fastidiosa* (Figura 6).

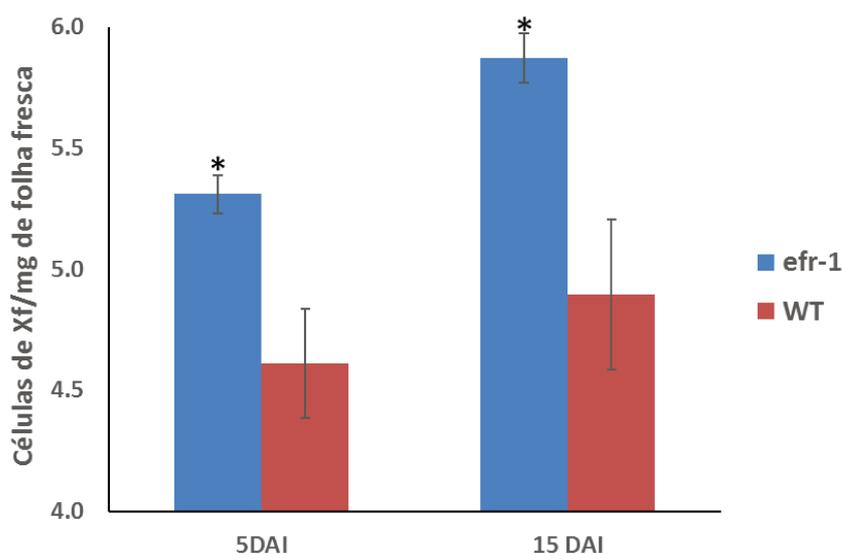


Figura 6 – População de *Xylella fastidiosa* 11399-GFP nas folhas de *A. thaliana* mutantes (*efr-1*) e selvagens (WT) em 5 e 15 DAI. Quantificação bacteriana obtida com primers e sonda específica para *X. fastidiosa* utilizando DNA de folhas inoculadas como *template* nas análises por qRT-PCR. Os valores representam médias de três leituras entre pelo menos 5 repetições biológicas para cada tratamento (n = 5). A comparação de médias foi feita por teste t e as barras representam o erro padrão entre as repetições. * Indica diferença significativa com $p < 0,05$ entre WT e *efr-1* em cada tempo avaliado. Leituras de *ct* determinadas em aparelho 7500 Fast Real Time PCR System (Thermo Scientific).

A população bacteriana aumentou em ambas as plantas *efr-1* e WT de 5 para 15 DAI. Além disso, a quantidade de células de *X. fastidiosa* mostrou-se estatisticamente mais elevada nos tecidos das plantas mutantes durante os dois tempos avaliados. Em 15 DAI, a população de *Xylella fastidiosa* nos tecidos das plantas *efr-1* foi cerca de 10 vezes superior àquela observada em WT no mesmo período.

5.3. Detecção de *X. fastidiosa* nos tecidos de *A. thaliana* por Microscopia de fluorescência

Considerando que a bactéria *X. fastidiosa* utilizada nas inoculações das plantas deste trabalho expressa a proteína verde fluorescente GFP, foi possível

detectar a presença desta bactéria nos vasos de xilema das plantas WT e mutantes através de análises por microscopia de fluorescência. (Figura 7).

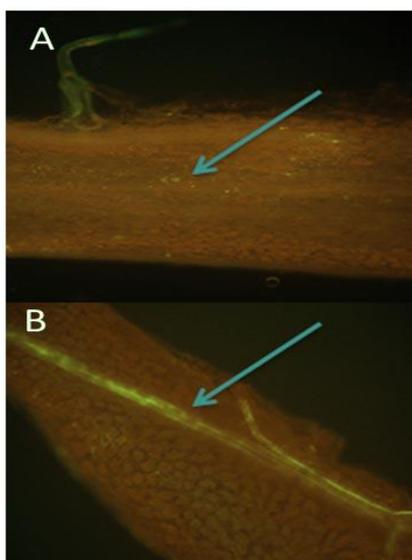


Figura 7 – Detecção de fluorescência da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein* – GFP) emitida pela bactéria *X. fastidiosa* em *A. thaliana* WT (A) e *efr-1* (B) em 5 DAI. As setas indicam a presença da bactéria nos vasos do xilema.

Estas análises permitiram verificar também a maior população bacteriana nas plantas *efr-1* em detrimento às *WT*. Apesar dos dados gerados por qRT-PCR permitirem uma análise mais robusta e precisa acerca da quantidade de *X. fastidiosa* nos tecidos foliares de *A. thaliana*, as análises por microscopia permitem a visualização da colonização nos tecidos do xilema, dando suporte qualitativo aos dados quantitativos apresentados anteriormente.

5.4. Sintomas em *A. thaliana* desafiadas com *X. fastidiosa*

A avaliação de alterações morfológica foi feita nas plantas *efr-1* e *WT* de *A. thaliana* visando determinar os efeitos da infecção de *X. fastidiosa* e/ou da ausência do receptor EFR no surgimento dessas alterações. As plantas avaliadas fazem parte do mesmo experimento apresentado anteriormente em que a população de *X. fastidiosa* foi quantificada nos intervalos de 5 e 15 DAI.

Embora em 5 DAI tenha sido verificado que ambas as plantas *efr-1* e *WT* apresentavam uma elevada quantidade de bactérias nas folhas, mais de 10^4

unidades formadoras de colônia (UFC) por mg de tecido fresco, nenhum sintoma foi observado até esse período de infecção nas plantas mutantes e selvagens (Figura 8). Os primeiros sintomas, ou alterações morfológicas, manifestaram-se nas folhas somente aos 15 DAI. De modo geral, as alterações morfológicas que foram associadas com sintomas da bactéria correspondiam a murcha, despigmentação, pontos cloróticos, arroxejamento e alguns sinais de necrose principalmente nas folhas da roseta (Figura 8).

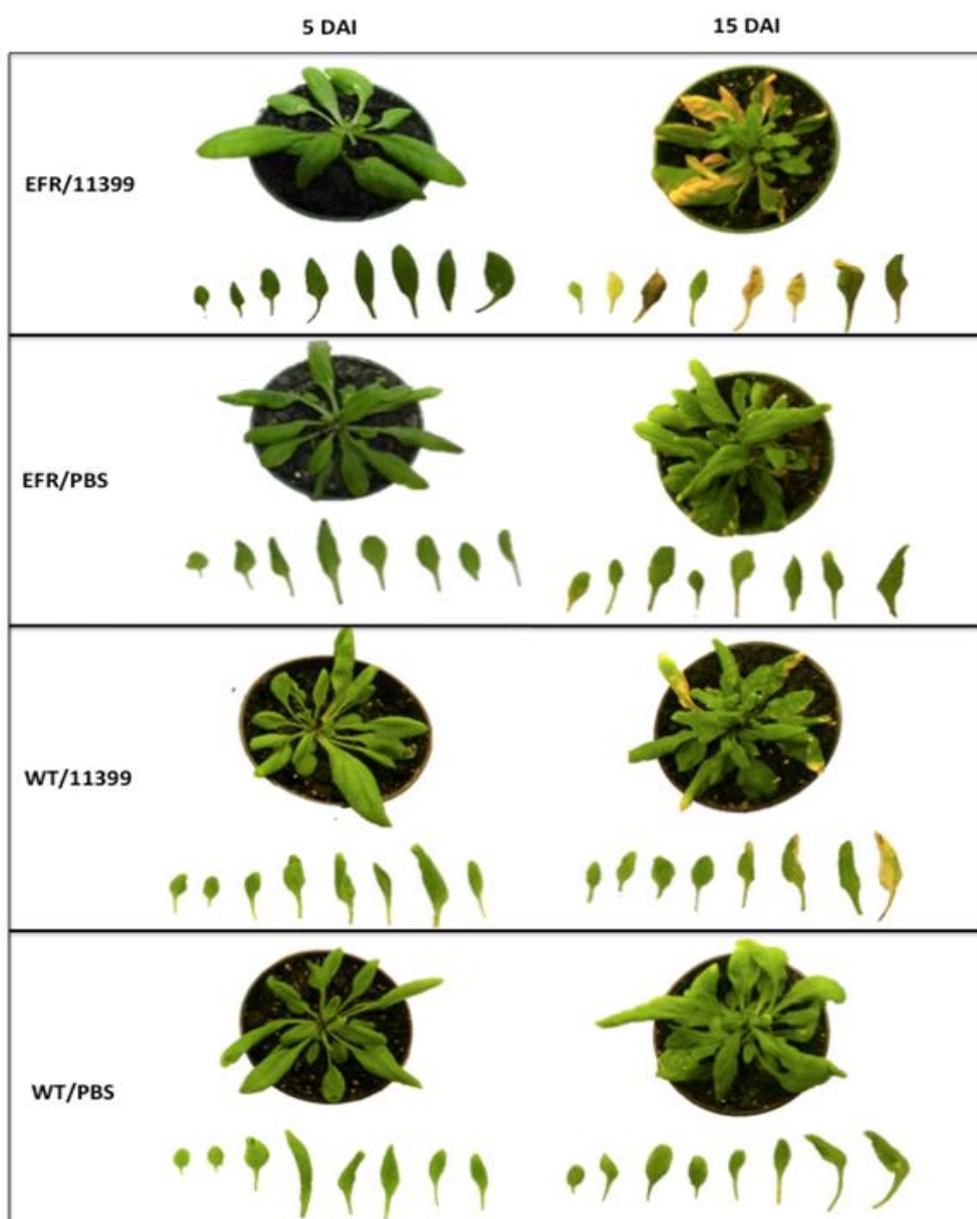


Figura 8 – Perfil das plantas de *A. thaliana efr-1* e *WT* inoculadas com *X. fastidiosa* 11399 ou PBS em 5 e 15 DAI. As alterações morfológicas associadas com sintomas são: murcha, despigmentação, pontos cloróticos, arroxejamento e alguns sinais de necrose principalmente nas folhas da roseta.

As alterações morfológicas observadas nas folhas em 15 DAI, e que aqui foram associadas a efeitos sintomáticos da colonização da *X. fastidiosa*, foram mais acentuados nas plantas mutantes *efr-1*. A quantificação da população bacteriana por qPCR corrobora essas observações, visto que aos 15 DAI a quantidade de bactéria nos tecidos das plantas mutantes (quase 10 milhões de UFC por mg de tecido fresco) corresponde a quase 10 vezes a população bacteriana verificada nos tecidos das plantas selvagens.

Com a observação de evolução gradativa destes sintomas entre as plantas, aos 25 DAI foi feita outra avaliação para determinar se o perfil sintomático se manteria entre as plantas *efr-1* e *WT*. E nesse ponto foi verificado que o percentual de plantas sintomáticas aumentou em todos os tratamentos, possivelmente devido ao processo natural de senescência dos indivíduos (Figura 9).

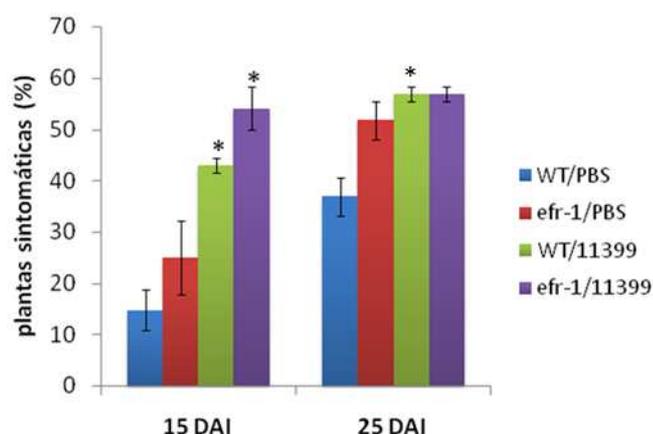


Figura 9 – Percentual de indivíduos sintomáticos de *A. thaliana* mutantes (*efr-1*) e selvagens (WT) inoculadas com *X. fastidiosa* ou PBS em 15 e 25 DAI. Os valores representam a média da frequência de indivíduos sintomáticos por tratamento determinada por 3 avaliadores. A comparação das médias foi feita por teste t e * indica a diferença significativa entre os tratamentos com e sem bactéria (controle com tampão PBS) em cada tempo de infecção e considerando $p < 0,05$. As primeiras alterações morfológicas (murcha, despigmentação, pontos cloróticos, arroxamento e alguns sinais de necrose) apareceram apenas em 15 DAI. Como essas alterações também estão associadas com senescência natural, também foram verificadas nas plantas inoculadas com tampão PBS, porém são mais evidentes nas plantas infectadas com a bactéria. Em 15 DAI, a frequência de plantas sintomáticas é maior tanto em *efr-1* quanto WT. Em 25 DAI, todos os tratamentos aumentaram a frequência de indivíduos sintomáticos e embora ainda se observa uma tendência de maior número de plantas sintomáticas nos tratamentos com bactéria, a diferença significativa apenas é verificada entre as plantas WT.

Os efeitos sintomáticos e de colonização observados reforçam a hipótese de que o receptor EFR está relacionado com o reconhecimento de *X. fastidiosa*, o que possibilita a contenção de sua colonização e dos sintomas em período inicial de infecção.

A partir de 25 DAI, a severidade dos sintomas passou a apresentar um perfil similar entre *efr-1* e *WT* inoculadas tanto com *X. fastidiosa* quanto com PBS, indicando que os sintomas observados a partir daí estão mais associados à senescência natural da planta em estágios finais de ciclo de vida.

5.5. Determinação de ROS nos tecidos de *A. thaliana*

5.5.1. Método histoquímico

A maior incidência e severidade de sintomas associada a uma maior multiplicação de *X. fastidiosa* nas plantas mutantes *efr-1* nos estágios iniciais de infecção sugere que a ausência do receptor prejudica o desencadeamento de resposta de imunidade inata contra *X. fastidiosa* devido a ineficiência de reconhecimento de padrão molecular associado ao patógeno (PAMP).

Considerando que uma explosão oxidativa (*oxidative burst*) representa uma resposta inicial relacionada ao desencadeamento de PTI em plantas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi determinada nas folhas de *efr-1* e *WT* a partir de coloração histoquímica utilizando o cromógeno diaminobenzidina (DAB) que detecta a presença de peróxido de hidrogênio nos tecidos (DAUDI *et al.*, 2012). A detecção da produção de ROS foi avaliada 24 horas após a inoculação (HAI) e 7 DAI (Figura 10).

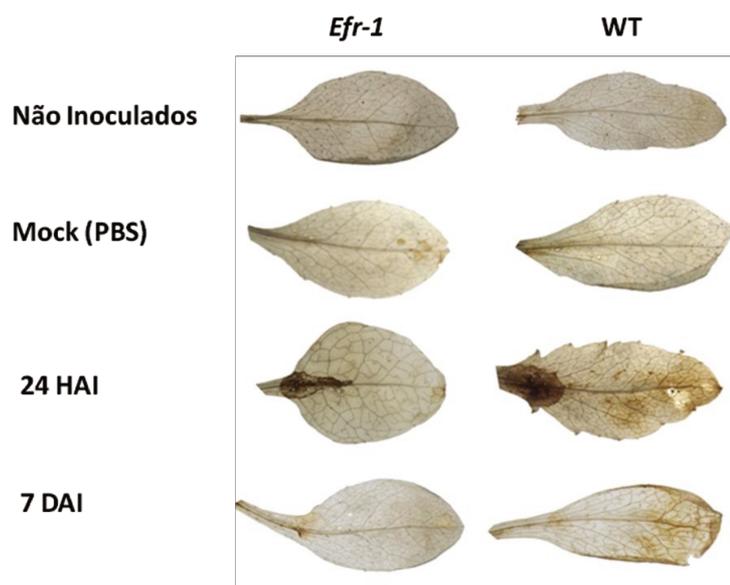


Figura 10 –Detecção de ROS nas folhas de *A. thaliana* mutantes (*efr-1*) e selvagens (*WT*) infectadas com *X. fastidiosa*. A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos tecidos foi detectada através de reação com 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Foram utilizadas folhas em similar fase de desenvolvimento e as avaliações foram feitas 24 horas após inoculação (24 HAI) e 7 dias após inoculação (7 DAI). *Mock-inoculated* refere-se às plantas inoculadas com tampão salino-fosfato (PBS). A produção de ROS nos tecidos foliares foi avaliada em microscópio estereoscópio a partir da intensidade de áreas da folha coradas em marrom.

A intensidade de manchas marrons observadas nos tecidos representa os efeitos da produção de ROS nos tecidos. Em 24 HAI, o acúmulo de ROS é mais evidente em folhas *WT* do que em *efr-1*. Aos 7 DAI, embora pouco evidente, a produção de ROS ainda pode ser visualizada nas folhas de *WT*, ao passo que nenhuma reação é observada nas folhas de *efr-1* infectadas com *X. fastidiosa*. Estes resultados reforçam a ideia de que a ausência de EFR nas plantas mutantes *efr-1* prejudica a percepção da *X. fastidiosa* e, conseqüentemente, a ativação de resposta de defesa do tipo PTI.

5.5.2. Método de luminescência

Visando verificar se as plantas mutantes para o receptor EFR realmente seriam prejudicadas quanto ao reconhecimento da bactéria *Escherichia coli* que é ressaltado na literatura (KUNZE et al., 2004), a produção de ROS foi comparada

entre *efr-1* e *WT* em presença desta bactéria a partir de método luminométrico (ROUX et al., 2011). A quantidade de ROS produzida pelas plantas selvagens de *A. thaliana* (*WT*) foi mais de duas vezes superior à quantidade de ROS produzida nas plantas *efr-1* (Figura 11). Isso permite inferir que a resposta de defesa de imunidade inata do tipo PTI é prejudicada na ausência do receptor EFR por prejudicar o reconhecimento de EF-Tu como PAMP. Entretanto, apesar de prejudicadas, um certo nível de ROS é ainda observado em *efr-1*.

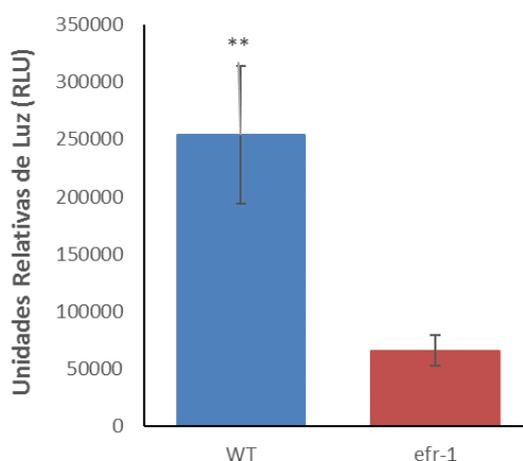


Figura 11 – Produção de ROS quantificada em discos foliares de *A. thaliana* mutantes (*efr-1*) e selvagens (*WT*) em presença da bactéria *E. coli*. Os valores de RLU foram normalizados em relação aos tratamentos controle sem a presença da bactéria. Os valores representam a média entre as leituras ao longo de 30 minutos e as barras representam o erro padrão entre as leituras. A comparação das médias foi feita por teste t e ** significa diferença altamente significativa entre *WT* e *efr-1*.

Além da quantificação de ROS em decorrência da presença da bactéria, o peptídeo elf-18 de *E. coli* foi sintetizado e a quantificação de ROS em resposta ao epítipo de reconhecimento do receptor EFR foi avaliada nas mesmas condições experimentais. Assim, em presença de elf18_{*E. coli*}, foi possível confirmar a especificidade no reconhecimento da região N-terminal de EF-Tu pelo EFR, uma vez que a presença do peptídeo desencadeou atividade elicitora apenas nas plantas selvagens de *A. thaliana* (Figura 12).

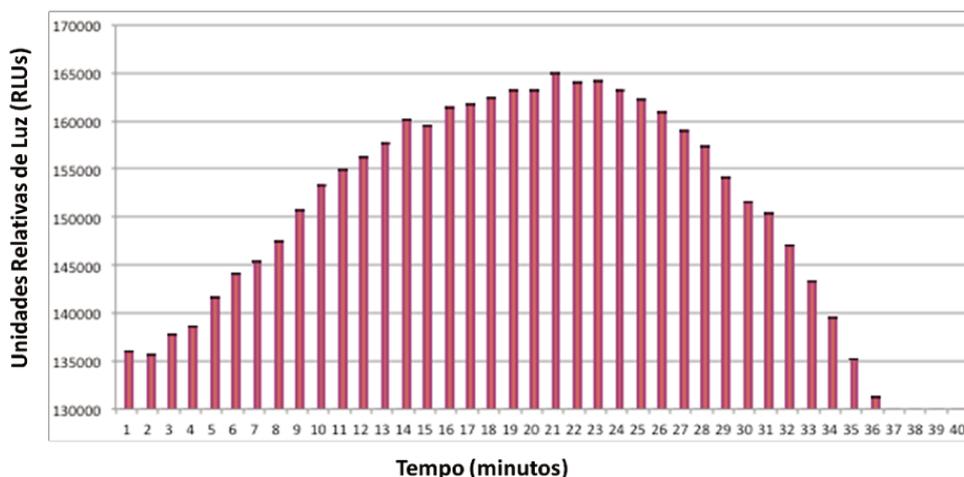


Figura 12 – Quantificação de ROS em discos foliares de *A. thaliana* mutantes *efr-1* e selvagens *WT* em presença do peptídeo elf18 de *E. coli*. A quantificação de ROS foi verificada apenas nos tecidos das plantas selvagens (barras vermelhas).

Dessa forma, foi demonstrado que as plantas selvagens (*WT*) de *A. thaliana* reconhecem o peptídeo elf-18 de *E. coli* como PAMP e ativam a produção de ROS para sinalizar resposta de defesa do tipo PTI.

A produção de ROS em decorrência da presença da bactéria *E. coli*, verificada em ambas as plantas selvagens (*WT*) e mutantes *efr-1* (Figura 11) sugere que houve sinalização mediada por ROS em ambas as plantas, apesar de mais intenso nas plantas selvagens. Isso se deve a uma sinalização decorrente do reconhecimento de alguma molécula elicitadora produzida pelo patógeno que não apenas o EF-Tu. Já na Figura 12, a produção de ROS devido ao elicitor específico elf18 apenas nas plantas selvagens demonstra a especificidade do receptor ao ligante elf18 que apenas foi reconhecida pelo receptor EFR das plantas selvagens, o que demonstra a total perda de percepção de elf18 nas plantas mutantes com *EFR* silenciado (KUNZE et al., 2004).

5.6. Identificação de plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*

Após processo de transformação genética, 100 brotos do cultivar RP-1 de *Nicotiana tabacum* foram selecionados e transferidos para vasos pequenos

contendo substrato acrescido de vermiculita. Após o crescimento das plântulas, que se deu em condições controladas de temperatura (22 °C) e fotoperíodo (12 horas), foram destacadas amostras de folhas suficientemente expandidas destas plantas e o DNA desses tecidos foi extraído (DOYLE & DOYLE, 1990).

Das 100 plantas avaliadas, foram identificados 20 indivíduos transgênicos, detectados a partir de PCR com base em sequências específicas contidas no vetor (promotor *35S CaMV* e *AtEFR*) (Figura 13).

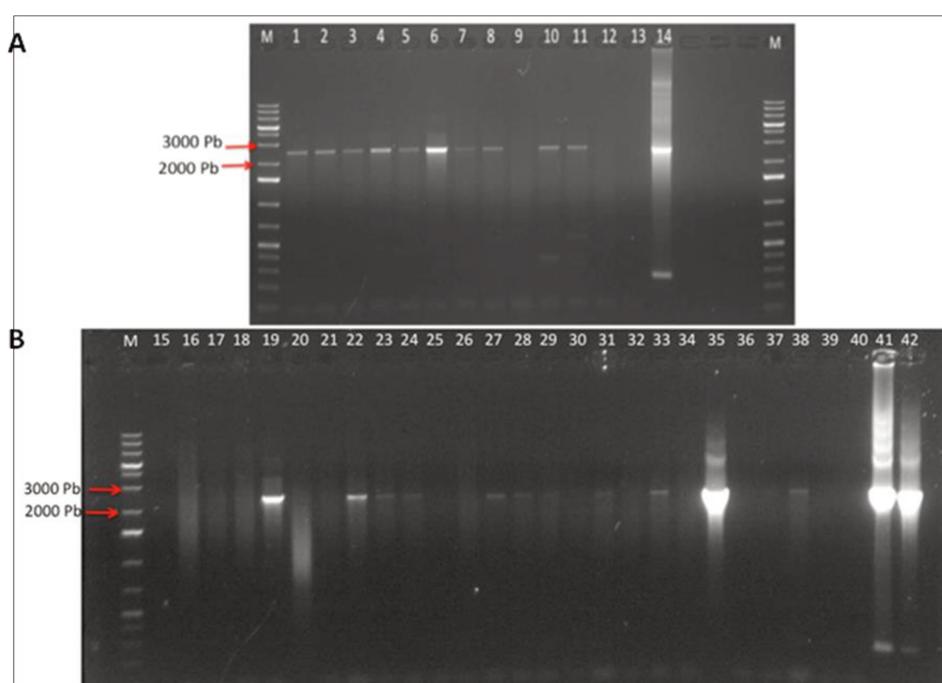


Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v) utilizando produtos de PCR para identificação de transgênicos. Poços 1-11 e 16-38: Amostras de plantas de *N. tabacum* utilizadas em processo de transformação. 12 e 39: Controle negativo (água). 14, 41 e 42: Vetor plasmidial contendo a construção 35S –EFR; M: Marcador de peso molecular (*DNA Ladder 1 Kb Plus Invitrogen*). As setas indicam os fragmentos de 2000 e 3000 pb no marcador de peso molecular.

Foi verificado fragmentos de tamanho ao redor de 2500 pb entre 20 amostras de plantas (produtos de PCR) presentes nos 2 géis de agarose. O tamanho do fragmento amplificado nessas amostras corresponde ao tamanho esperado do *amplicon* (2408 Pb) ao utilizar os *primers* que se anelam em regiões

específicas do promotor CaMV35S (*Forward*) e do gene de interesse *EFR* (*Reverse*) que estão no contidas no vetor.

Na Figura 13A, os fragmentos no tamanho esperado podem ser observados entre os poços 1-8, além de 10 e 11. No gel da Figura 13B, o fragmento em tamanho esperado é verificado entre as amostras presentes nos poços 19, 22, 23, 24, 27, 28, 31, 33, 35 e 38. Na amostra dos poços 9, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 25, 26, 29, 30, 32, 34, 36 e 37 não foi verificada a amplificação de nenhum fragmento, e, portanto, foram consideradas amostras de plantas não transformadas.

Considerando que o produto de PCR do plasmídeo de *A. tumefaciens* utilizado nas transformações (controle positivo, poços 14, 41 e 42) amplificou fragmento na mesma altura observada nas amostras destacadas, podemos inferir que nestas plantas o gene de interesse foi inserido no genoma com sucesso.

A partir dos 100 brotos previamente selecionados em placas contendo o herbicida fosfinotricina, foi possível obter 20 indivíduos transformados, o que mostra uma eficiência de 20 % a partir da seleção das plântulas. Das 20 plantas transgênicas, três plantas foram perdidas durante o processo de transferência para vasos maiores e aclimatação. As 17 plantas transgênicas, juntamente com outras 10 selvagens (controle) foram aclimatadas e transferidas para casa de vegetação para avaliação de expressão gênica e obtenção de sementes (geração F1).

5.7. Nível de expressão de *EFR* por nas plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum*

A expressão do transgene *EFR* foi avaliada nas plantas geneticamente modificadas de tabaco a partir de reações de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Inicialmente, as amostras de RNA extraídas utilizando reagente *Trizol* e que foram purificadas e tratadas com DNase tiveram a qualidade da extração verificada a partir de reações de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 14).

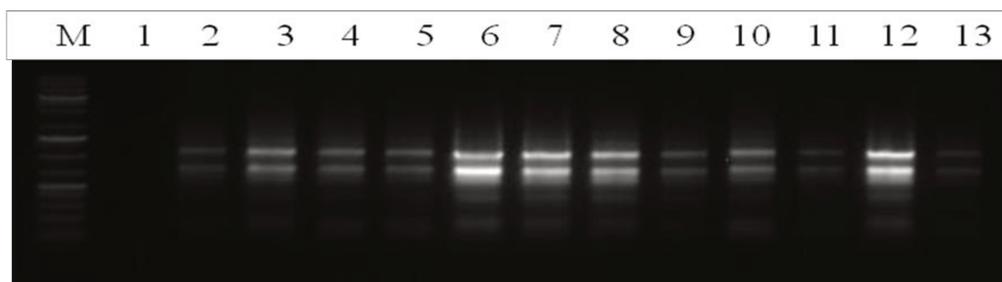


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) ilustrando a qualidade da extração de RNA de algumas amostras de folhas de *Nicotiana tabacum* transgênicas superexpressando *EFR* e selvagem. M: Marcador de peso molecular (*DNA Ladder 1 Kb Plus, Invitrogen*). 1: Controle negativo; 2-11: amostras de RNA extraídas de folhas de plantas transgênicas; 12 e 13: amostras de RNA extraídas de folhas de plantas selvagens.

A presença dos dois fragmentos tipicamente observados em gel de agarose referentes as subunidades de RNA ribossômico 18S e 28S, além de ausência de material degradado demonstra a eficiência no processo de isolamento do RNA. Assim, as amostras foram quantificadas e uma mesma quantidade de RNA de cada amostra (1 micrograma) foi utilizada em reações de síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de kit contendo enzima transcriptase reversa. O cDNA gerado foi diluído (50 X) e estas amostras foram utilizadas na avaliação da expressão do transgene *EFR* por qRT-PCR.

As reações foram realizadas a partir de kit de expressão genica *GoTaq® qPCR Master Mix (Promega)* e *primers* específicos para amplificação do gene de referencia (*ARPC3*) e do gene de interesse *EFR*. Os dados gerados permitiram verificar que o conjunto de *primers* utilizados para amplificação do gene de referência *ARPC3* foi adequado, visto que foi detectado um único pico na curva de *Melt* (Figura 15A). Além disso, a baixa variação de expressão observada entre as plantas, bem como a amplificação em ciclos próximos (praticamente o mesmo *ct*) garantem o uso de gene de referência adequado (Figura 15B).

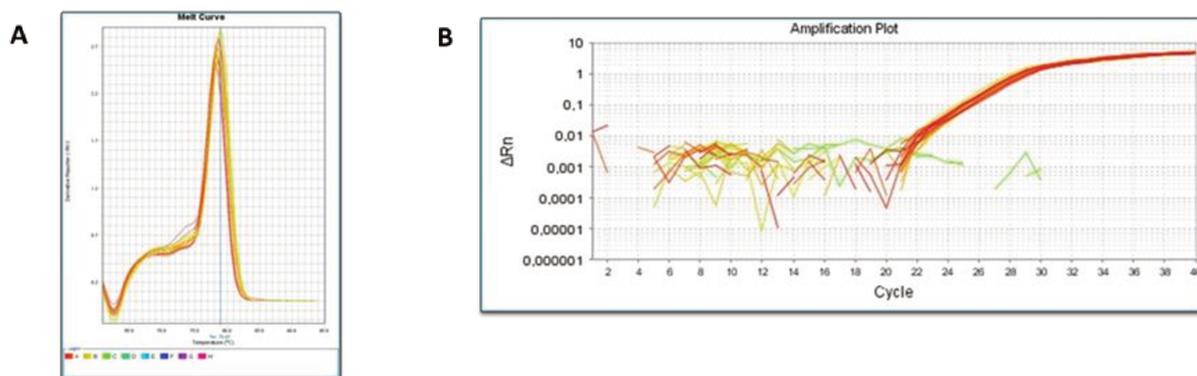


Figura 15 – Controle interno da expressão gênica de *ARPC3*. Em A é verificada a curva de dissociação ou curva de *Melt* com pico único demonstrando especificidade dos *primers* no anelamento. Em B é apresentada a curva de expressão do gene *ARPC3*, onde todas as mostras apresentam expressão em mesmo ciclo de amplificação.

Os *primers* utilizados para amplificação do transgene *EFR* também se mostraram adequados, visto que também foi verificado apenas um único pico na curva de *Melt* (Figura 16A). Além disso, apesar dos mesmos valores de ct quando nas reações com *ARPC3*, os diferentes ciclos de amplificação com *primers* para *EFR* sugerem que a expressão do transgene é variável entre as plantas transgênicas avaliadas (Figura 16B).

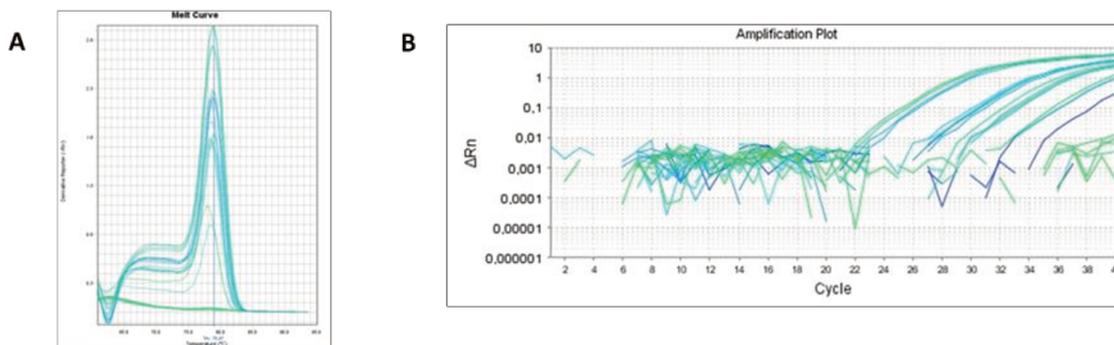


Figura 16 – Controle interno da expressão gênica de *EFR*. Em A é verificada a curva de dissociação ou curva de *Melt* com pico único demonstrando especificidade dos *primers* no anelamento. Em B é apresentada a curva de expressão do gene *EFR*, onde todas as mostras apresentam expressão em ciclos distintos de amplificação, demonstrando diferenças na expressão do transgene *EFR*.

Os dados brutos de *ct* gerados foram utilizados para avaliação da eficiência de amplificação dos *primers* a partir da plataforma *Miner* (ZHAO & FERNALD, 2005). Os dados obtidos foram utilizados para verificar o nível de expressão genica nos tecidos utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Dos 17 eventos avaliados, apenas 7 apresentaram superexpressão do transgene *EFR* (Figura 17).

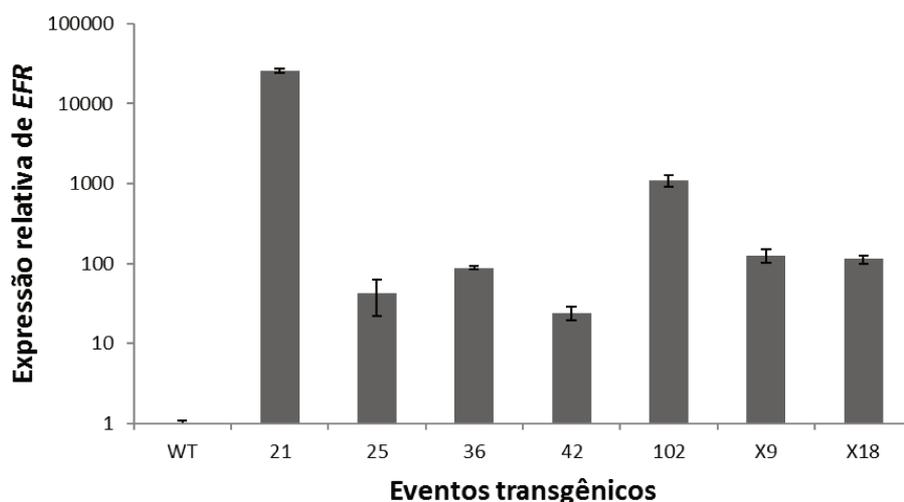


Figura 17 - Nível de transcrição relativa do gene *EFR* entre os eventos transgênicos de *Nicotiana tabacum* cv. RP-1. O nível de expressão de *EFR* foi determinado a partir de análises de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Dados de expressão foram normalizados com o gene de referência *ARPC3* de tabaco e os resultados são apresentados como médias de valores obtidos a partir de duas repetições biológicas e três repetições técnicas. As barras representam o erro padrão obtido em cada tratamento.

Foi observada uma grande variação na expressão de *EFR* nos tecidos foliares nos eventos transgênicos de *N. tabacum* avaliados. O evento 21, por exemplo, foi o que apresentou maior expressão de *EFR*, com cerca de 1000 vezes a expressão verificada nos tecidos foliares da planta 42, que por sua vez apresentou a menor expressão de *EFR*. A diferença de expressão gênica observada entre os eventos de transformação pode estar associada a diversos fatores, como o número de cópias do transgene inseridas no genoma, a posição de inserção no genoma, a presença de elementos transponíveis, efeitos de *splicing* alternativo, modificações pós-transcricionais e outros fatores que podem atuar na regulação da expressão gênica.

5.8. Detecção da proteína recombinante GFP fusionada ao EFR em plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*

A solução de proteínas totais extraídas de folhas coletadas de plantas transgênicas e selvagens (não transformadas) foi inicialmente estimada a partir do método de Bradford (1976) utilizando-se equação da curva-padrão de albumina sérica bovina (BSA) (Figura 18).

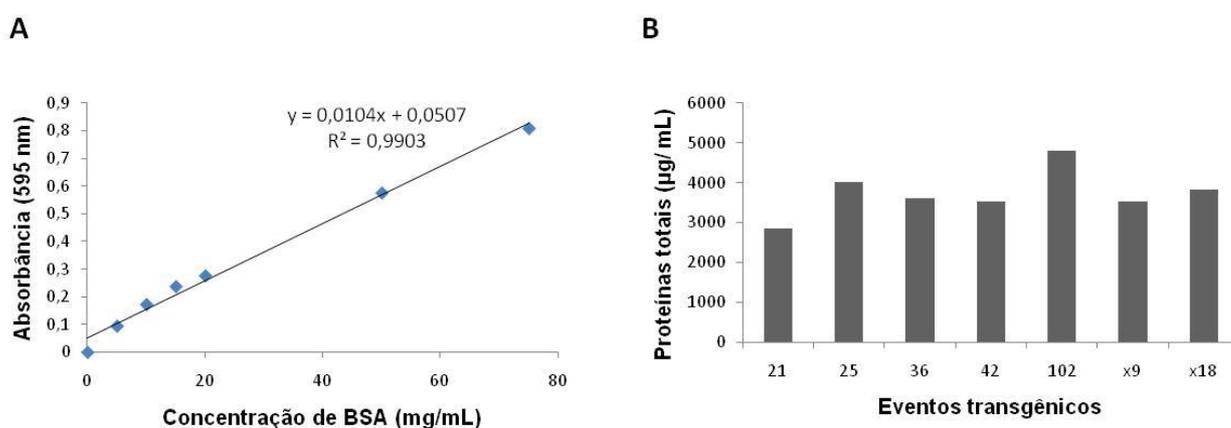


Figura 18 - Determinação de proteínas nas folhas de *Nicotiana tabacum* superexpressando EFR. Em A é apresentada a curva-padrão bem como a equação da curva que permitiu a quantificação de proteínas e em B observa-se a quantidade de proteínas determinada por método de Bradford.

A partir da determinação da concentração de proteínas, as amostras foram padronizadas para uma mesma concentração e separadas em processo de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida utilizando método SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Os géis corados com *Coomassie blue* apesar de não serem suficientes para detectar e quantificar a proteína heteróloga EFR permitem observar a qualidade da extração e o perfil da separação de proteínas totais solúveis (Figura 19).

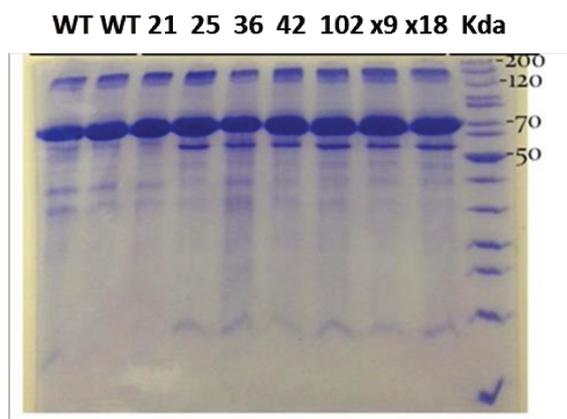


Figura 19. Perfil de separação de proteínas totais de folhas de *Nicotina tabacum* por SDS-PAGE utilizando gel de 7 % (m/v). As proteínas totais foram extraídas de folhas de plantas de *N. tabacum* selvage (WT) e de sete eventos transgênicos que apresentaram expressão de EFR confirmada por qRT-PCR. Kda representa o marcador de peso molecular em kilodaltons

Após a separação das amostras de proteínas por peso molecular (SDS PAGE), as proteínas das amostras foram transferidas do gel 7 % (m/v) para membranas de nitrocelulose por método de *western blotting*. Reações de *immunoblotting* utilizando anticorpo primário anti-gfp (fração IgG de coelho/*rabbit*) e anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado com a enzima peroxidase permitiram detectar de modo indireto a presença da proteína heteróloga produzida a partir da construção 35S::EFR-GFP-His. A detecção da reação foi visualizada em filme fotográfico por quimiluminescência após adição de solução de detecção (*ECL Western Blotting Detection Reagent, G.E Healthcare Life Sciences*) (Figura 20).



Figura 20. Detecção indireta da expressão da proteína EFR com anticorpo anti-GFP. A expressão da proteína EFR nas folhas das plantas transgênicas foi realizada a partir da detecção de GFP fusionado ao EFR a partir do uso de anticorpo primário anti-GFP (IgG de coelho). A detecção do anticorpo primário se deu a partir do anticorpo secundário anti-coelho e posterior detecção por quimiluminescência em filme fotográfico. WT refere-se à amostra de proteína extraída de planta selvagem não-transformada; 21; 25; 36; 42; 102; x9 e x18 referem-se aos eventos de transformação de *N. tabacum* superexpressando EFR nas quais foi verificada anteriormente a expressão em nível de transcrito. A flecha aponta para posição na membrana referente a 60 kDa (Peso molecular em kilodaltons).

A observação de fragmento detectado apenas na região utilizada contendo amostras de proteínas de *Nicotiana tabacum* transgênicas indica a presença de GFP e, como este se encontra fusionado ao EFR, conseqüentemente demonstra a expressão da proteína EFR presente nas plantas transgênicas de *N. tabacum*.

5.9. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas plantas transgênicas de *N. tabacum* em resposta ao peptídeo elf18.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada nos tecidos das plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* em presença dos peptídeos sintéticos que se pretendia avaliar atividade elicitora. Inicialmente foi utilizado apenas um dos eventos transgênicos (identificado como planta 25) para otimizar as reações e avaliar a sinalização PTI mediada pela produção de ROS em decorrência da presença de moléculas elicitoras.

O peptídeo sintético relacionado ao epítopo de reconhecimento da região acetilada N-terminal de EF-Tu de *Escherichia coli* (elf18_{E.coli}) foi inicialmente utilizado para checar se o mesmo reconhecimento que ocorre naturalmente por EFR em *Brassicaceae* se manteria entre as plantas transgênicas de *N. tabacum* (KUNZE et al., 2004). O resultado evidenciou um pico intenso de produção de ROS nas plantas transgênicas em decorrência da presença de elf18_{E.coli} (Figura 21), o que demonstra a atividade elicitora desse peptídeo nas plantas transgênicas de *N. tabacum*. Foi verificado, dessa forma, que o sistema de percepção baseado no receptor EFR foi transferido com sucesso pelo menos para este evento de transformação, pois assim como em *Arabidopsis*, tabaco expressando EFR também passou a reconhecer elf18_{E.coli} e desencadear resposta PTI com sinalização mediada pela produção de ROS.

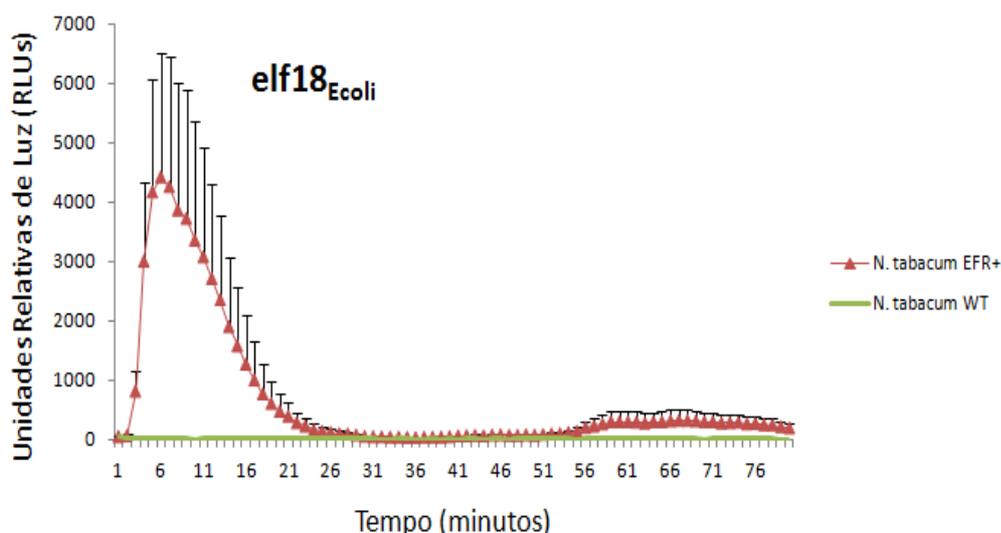


Figura 21 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* em presença do peptídeo sintético elf18 de *E. coli*. A quantificação de ROS nos discos foliares foi feita por método quimioluminométrico em aparelho *Varioskan Flash multireader* (Thermo Scientific) utilizando peptídeo sintético elf18 de *E. coli* (elf18_{Ecoli}).

Após validar a transferência e comprovar o funcionamento do novo sistema de percepção baseado em EFR em *N. tabacum*, a próxima etapa do trabalho pretendeu avaliar a produção de ROS, porém dessa vez em presença do peptídeo elf18 sintetizado a partir da região homologa ao elf18_{Ecoli} em *Xylella fastidiosa* (elf18_{xf}). A maior quantidade de ROS quantificada nas plantas transgênicas indica que houve reconhecimento do peptídeo sintético elf18_{xf} pelo receptor EFR na planta transgênica de tabaco avaliada (Figura 22). Da mesma forma, a ausência de reconhecimento nas plantas selvagens demonstra o não reconhecimento já esperado de elf18_{xf}, visto que EFR foi identificado apenas em espécies de plantas de *Brassicaceae*, não sendo identificado em *Solanaceae*. A produção de ROS indica não apenas o reconhecimento de elf18_{xf} pelo receptor, mas também o desencadeamento de sinalização para resposta de imunidade inata PTI pelo reconhecimento de PAMP de *X. fastidiosa*. Curiosamente, é observado um segundo pico na produção de ROS nas plantas transgênicas em presença de elf18 de *X. fastidiosa*. A produção de ROS apresenta-se como uma das primeiras respostas de sinalização observada após a percepção da presença dos patógenos, indicando poucos minutos após a percepção dos PAMPs. O primeiro pico representa

a resposta quase que imediata de reconhecimento de elf18_{xf} pela presença do receptor EFR incorporado nas células. O segundo pico pode representar uma sinalização decorrente da percepção do peptídeo por algum receptor desconhecido ativado pela presença de EFR ou mesmo uma produção de ROS tardia que é tipicamente verificada em interações incompatíveis no qual o hospedeiro é resistente (TORRES et al., 2006).

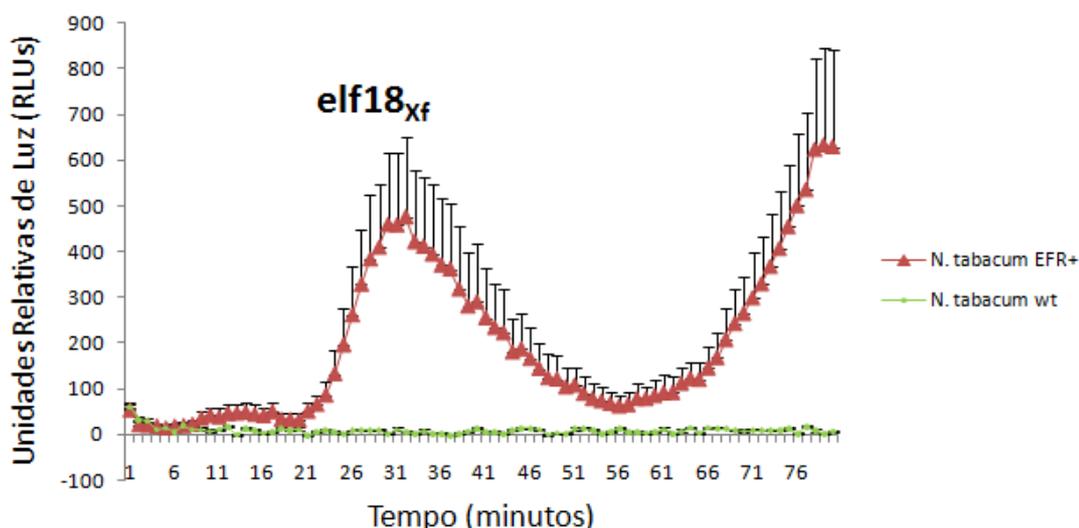


Figura 22 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* em presença do peptídeo sintético elf18 de *Xylella fastidiosa*. A quantificação de ROS nos discos foliares foi feita em aparelho *Varioskan Flash multireader* (Thermo Scientific) utilizando peptídeo sintético elf18 ($100 \mu\text{M}$) de *Xylella fastidiosa*.

O receptor EFR transferido que foi transferido para as plantas de tabaco apresenta a capacidade de conferir resistência *broad spectrum*, ou seja, podem reconhecer e conferir resistência contra uma classe de microrganismos que compartilhem do mesmo PAMP de reconhecimento, ou mais especificamente, do mesmo epítipo elicitor. Suportado por essa característica e considerando que a bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xcc) possui na região elf18 da proteína EF-Tu uma grande similaridade com $\text{elf18}_{\text{Ecoli}}$, foi testado também se haveria alguma atividade elicitora de $\text{elf18}_{\text{Xcc}}$ nas plantas do evento transgênico de *N. tabacum* avaliado (Figura 23). O pico observado demonstra o reconhecimento do peptídeo sintético elf18 de Xcc como molécula elicitora, o que sugere o reconhecimento desse

peptídeo como PAMP para o receptor EFR. Embora testes *in vivo* sejam necessários, esta resposta de reconhecimento é interessante e sugere a habilidade de se conferir resistência *broad spectrum* tanto para *X. fastidiosa* quanto para *X. citri* no caso da transferência de receptor para plantas cultivadas que apresentem susceptibilidade a estas bactérias, como por exemplo as espécies de *Citrus*.

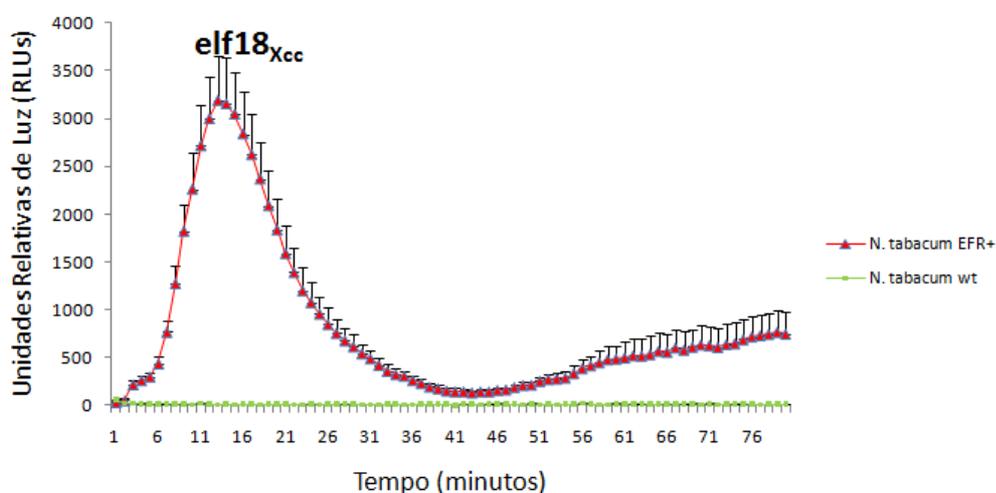


Figura 23 - Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* em presença do peptídeo sintético elf18 de *Xanthomonas citri* *supsp. citri*. A quantificação de ROS nos discos foliares foi feita em aparelho *Varioskan Flash multireader* (*Thermo Scientific*) utilizando peptídeo sintético elf18_{Xcc} como elicitador.

5.10. Avaliação de sintomas em *N. tabacum* desafiado com *X. fastidiosa*

As sementes obtidas das plantas transgênicas T0 de *N. tabacum* foram inicialmente selecionadas em meio contendo agente seletivo fosfotricina em diferentes concentrações para seleção da população de plantas em F1 que seria utilizada no experimento que envolve a inoculação de *X. fastidiosa* (Figura 24).

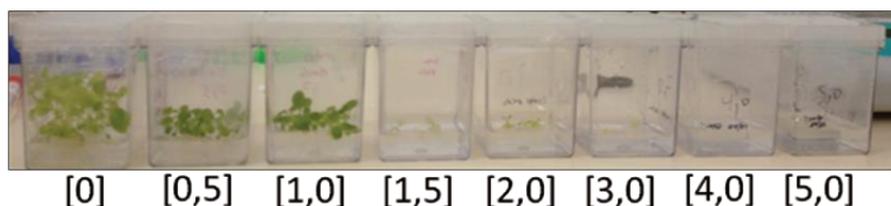


Figura 24 – Teste para seleção de plantas transgênicas de tabaco. A diferença de germinação e crescimento de plantas selvagens nos meios contendo diferentes concentrações de fosfotricina permitiu selecionar a concentração mais adequada do agente seletivo. Os números representam as concentrações de fosfotricina em $\mu\text{g/mL}$ presentes em meio MS/2.

Foi verificado que as plantas selvagens não germinaram ou não desenvolveram a partir de $1,5 \mu\text{g/mL}$ de fosfotricina. Para esse experimento, foi utilizada a fosfotricina no meio em concentração de $2,0 \mu\text{g/mL}$ para a seleção inicial das plantas transgênicas que posteriormente foram confirmadas por PCR. Entretanto, devido a fatores como taxas de germinação variável entre os eventos, contaminação ou morte de indivíduos durante a seleção e aclimação, apenas cinco eventos transgênicos de tabaco com número variado de indivíduos foram transferidos para as casas de vegetação e desafiados com *X. fastidiosa*. Para padronizar e facilitar as análises, os eventos de transformação selecionados passaram a ser designados T1, T2, T3, T4 e T5 (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificação e número de plantas transgênicas em cada evento de transformação de *N. tabacum* utilizadas no experimento de interação com *X. fastidiosa*

Eventos de transformação	Nº de indivíduos	Identificação original*
T1	20	25
T2	11	102
T3	12	X18
T4	11	X9
T5	3	21

* Identificação original refere-se à identificação dos eventos de *N. tabacum* transformadas (parentais) que foram avaliados quanto a expressão do transgene *EFR* em nível de transcrito e proteína. Descendentes de apenas cinco destes eventos foram selecionados e desafiados com *X. fastidiosa*.

A produção de ROS foi inicialmente quantificada em plantas de todos os cinco eventos transgênicos desse experimento em presença do elicitor elf18_{Ecoli} para verificar a funcionalidade do sistema de percepção baseado no receptor EFR que anteriormente foi validado em um dos eventos parentais (Figura 21).

Embora o evento T2 tenha produzido uma quantidade de ROS relativamente reduzida, nos demais eventos (T1, T3, T4 e T5) foi verificada uma elevada quantidade de ROS quando foi adicionado o peptídeo elf18_{Ecoli}. A alta produção de ROS nos quatro eventos transgênicos destacados valida a funcionalidade do receptor EFR transferido para estas plantas, conforme era de se esperar devido a atividade elicitora do peptídeo elf18_{Ecoli} já ter sido anteriormente verificada por Kunze et al., (2004) e demonstrada em um dos eventos transgênicos de tabaco avaliados anteriormente (Figura 21).

A baixa produção de ROS nas plantas transgênicas pertencentes ao evento T2 em presença de elf18_{Ecoli} sugere que estas plantas, apesar de estarem expressando EFR em nível de transcrito e de proteína, não apresentam EFR funcional quanto ao reconhecimento de elf18_{Ecoli} como PAMP e sinalização mediada por ROS. Estas plantas apresentaram uma produção de ROS e similar à produção de ROS observada nas plantas de tabaco controle não transformadas (WT) que são insensíveis ao peptídeo elf18_{Ecoli} pela ausência do receptor EFR. Os eventos das plantas transgênicas de tabaco foram também avaliados quanto à percepção do peptídeo elf18_{Xf}. Assim, foi quantificada a produção de ROS nos discos foliares dessas plantas e assim como na avaliação anterior, com exceção do evento T2, também foi verificado que os demais eventos transgênicos de tabaco (T1, T3, T4 e T5) aumentaram a produção de ROS em decorrência da percepção deste peptídeo (elf18_{Xf}) como molécula elicitora (Figura 25).

O evento T2 novamente apresentou comportamento similar às plantas controle não-transformadas, demonstrando que o receptor EFR apresenta-se com baixa funcionalidade, o que prejudicou a sinalização mediada por ROS possivelmente devido uma ineficiência de reconhecimento do peptídeo de *X. fastidiosa* como PAMP. A ineficiência de reconhecimento dos peptídeos em T2 também pode estar associada com a amostragem, visto que as análises foram feitas utilizando material foliar coletado de apenas uma planta de cada evento avaliado. Por estas análises, foi verificado que pelo menos quatro dos eventos transgênicos avaliados (T1, T3, T4 e T5) apresentaram resposta de sinalização mediada por ROS

quando em presença de elf18_{xf} e, embora o mesmo não tenha sido verificado para plantas de T2, indivíduos dos cinco eventos de tabaco superexpressando EFR foram selecionados e desafiados com *X. fastidiosa*.

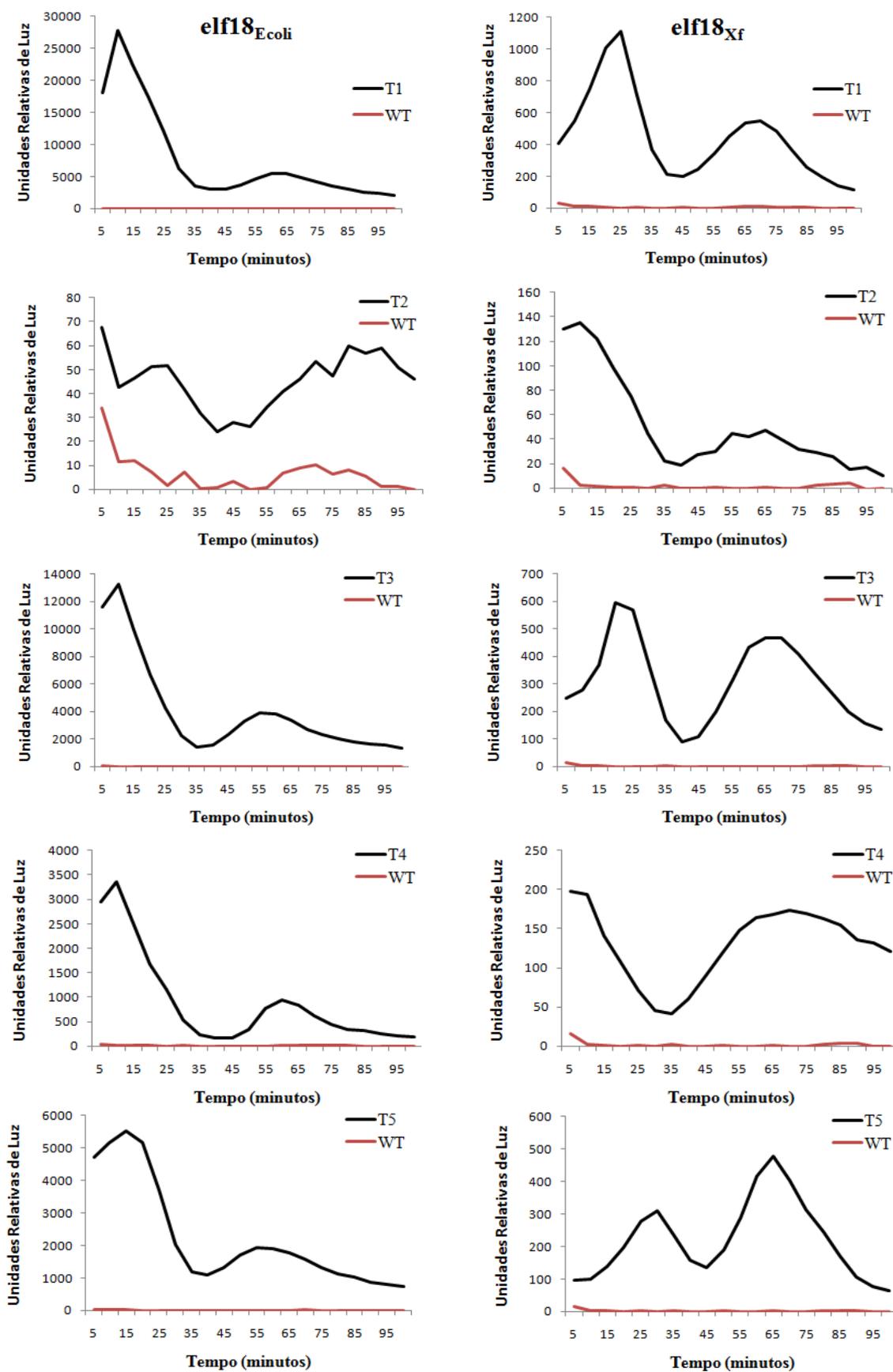


Figura 25 - Quantificação de ROS nas plantas selvagens de tabaco e nos eventos transgênicos T1, T2, T3, T4 e T5 em presença de peptídeo sintético *elf18_{Ecoli}* ou *elf18_{Xf}*.

As plantas selvagens e transgênicas de *N. tabacum* foram igualmente inoculadas com a linhagem 9a5c de *X. fastidiosa* e as plantas foram monitoradas semanalmente até o aparecimento dos sintomas. Embora o início do aparecimento de sintomas em tabaco inoculados com *X. fastidiosa* seja variável em função da linhagem e população bacteriana inoculada, normalmente os primeiros sintomas são observados em aproximadamente 60 dias após a inoculação (DAI) (OLIVER et al., 2014). Nas plantas utilizadas nesse experimento, entretanto, os sintomas surgiram precocemente em 37 DAI e foram detectadas plantas sintomáticas em todos os tratamentos avaliados, ou seja, em todos os eventos transgênicos e também nas plantas selvagens.

A quantificação de sintomas representa um processo importante no monitoramento de doenças e respostas de defesa das plantas, e as medidas geralmente utilizadas para quantificar os sintomas nas plantas são incidência e severidade (SEEM, 1984). Além da frequência de plantas sintomáticas, a incidência de sintomas é uma medida que pode também ser definida com base na frequência de partes de plantas doentes em uma população e, dessa forma, neste experimento a incidência foi determinada dessa forma, ou seja, pela frequência de folhas de *N. tabacum* apresentando efeitos de requeima ou clorose que são sintomas típicos da presença da bactéria *X. fastidiosa* em tabaco (LOPES et al., 2000; FRANCIS et al., 2008).

A severidade dos sintomas decorrentes da infecção de *X. fastidiosa* no xilema das plantas de tabaco selvagens e transgênicas superexpressando EFR foi avaliada através da atribuição de notas, conforme escala diagramática de sintomas em tabaco desenvolvida por Pereira (2015) (Figura 26).

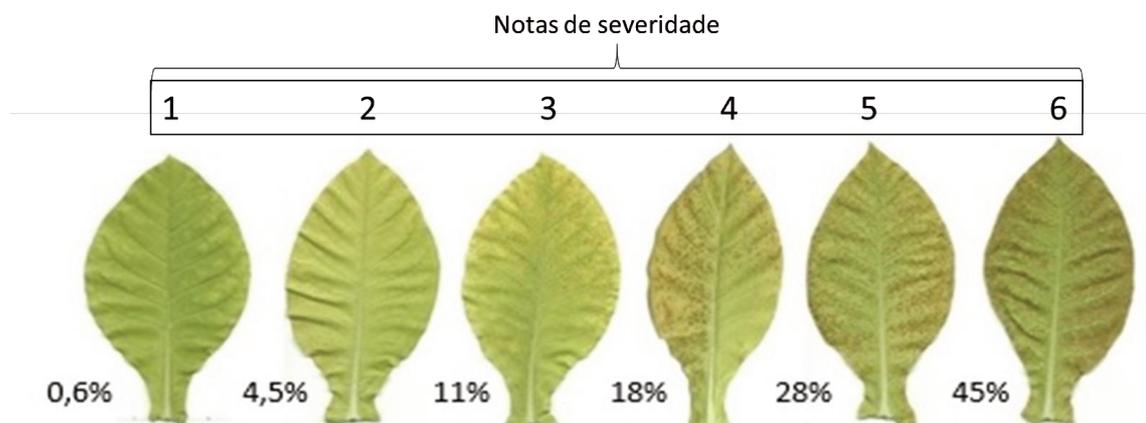


Figura 26 – Escala diagramática de sintomas. A escala diagramática foi utilizada para quantificar a severidade dos sintomas observados nas folhas de tabaco devido à infecção da *X. fastidiosa*. As notas de 1 a 6 representam a escala de evolução dos sintomas nas folhas de acordo com a área afetada (Nota 1: 0,6 %; Nota 2: 4,5 %; Nota 3: 11 %; Nota 4: 18 %; Nota 5: 28 %; Nota 6: 45 %). Além disso, foi atribuída a nota 7 para folhas mortas devido ao efeito máximo de agressividade bacteriana.

De modo geral, a severidade dos sintomas foi maior nas plantas selvagens durante a maior parte dos períodos de avaliação, entretanto, uma redução estatística significativa na severidade foi observada apenas nos eventos T4 (37 e 45 DAI) e T1 (64DAI) (Figura 27).

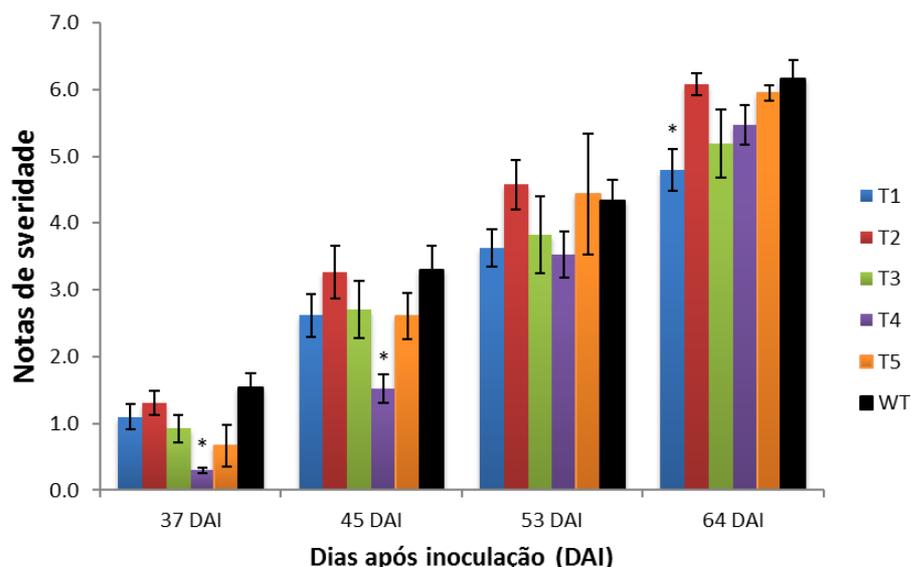


Figura 27 – Evolução da severidade de sintomas nas folhas sintomáticas das plantas de *N. tabacum* selvagem (WT) e transgênicas superexpressando EFR, agrupadas em blocos por tempo de avaliação. As avaliações foram realizadas a partir da atribuição de notas segundo escala diagramática de sintomas em 37, 45, 57 e 64 dias após inoculação (DAI) de *X. fastidiosa*. T1, T2, T3, T4 e T5 referem-se aos eventos de transformação de *N. tabacum* para superexpressão de EFR. Os valores utilizados para gerar o gráfico (eixo y) foram obtidos a partir da média de notas atribuídas por três avaliadores. As barras representam erro-padrão entre as avaliações e * representa diferença significativa em relação às plantas selvagens (WT) em cada tempo de avaliação ($p < 0,05$).

Foi observado que no início do processo infeccioso, ou pelo menos no início do aparecimento de sintomas (em 37 e 45 DAI), as plantas pertencentes ao evento T4 apresentaram folhas com menor severidade de sintomas, uma vez que, apresentaram percentual de área foliar com sintomas estatisticamente menor que os das plantas selvagens. Em 53 DAI, por sua vez, todos os eventos apresentaram-se estatisticamente iguais quanto à severidade dos sintomas. Já na última avaliação, em 64 DAI, as plantas do evento T1 apresentaram severidade de sintomas estatisticamente menor do que as plantas selvagens. Possivelmente, a ausência de diferença de severidade observada entre as plantas selvagens e as transgênicas pode ser devido a alta concentração de inoculo empregada, uma vez que, as folhas com sintomas mais severos encontravam-se próximo ao ponto de inoculação.

Os valores de AACPD foram determinados a partir das notas de severidade e foi verificado que ao avaliar o experimento como um todo, apenas as

plantas do evento T4 apresentaram diminuição significativa na severidade de sintomas quando comparado com as plantas selvagens (Figura 28).

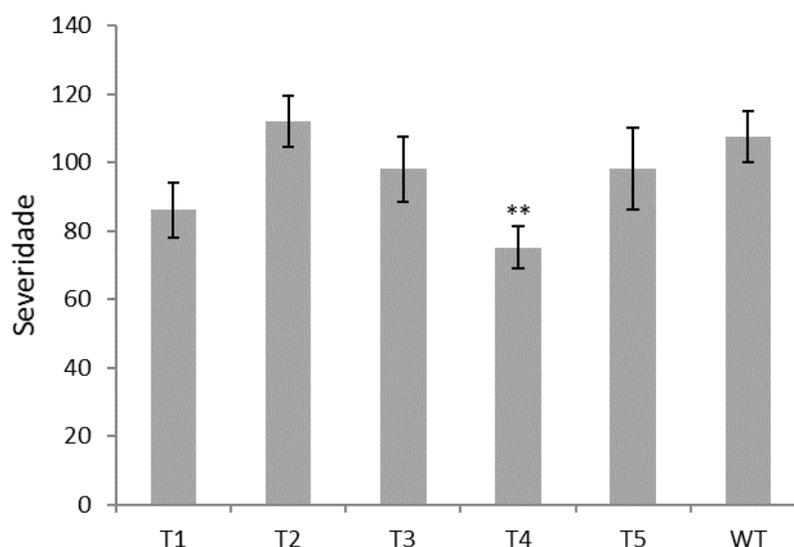


Figura 28 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em plantas de *N. tabacum* selvagem (WT) e transgênicas superexpressando o gene *EFR* de *Arabidopsis thaliana*. T1, T2, T3, T4 e T5 referem-se aos eventos transgênicos. Os valores foram obtidos a partir da média das AACPD determinadas por notas de severidade ao longo das avaliações. Os resultados representam a média das notas de severidade de todas as plantas em cada tratamento e determinadas por 3 avaliadores. As barras representam o desvio-padrão entre as médias dos avaliadores e ** representa diferença altamente significativa em relação às plantas selvagens (WT) considerando todo o período de avaliação ($p < 0,01$).

Além disso, quando comparado com as plantas selvagens, foi demonstrado que com exceção do evento T2, todos os demais eventos apresentaram tendência de menor severidade de sintomas ao longo de todo o experimento. Conforme destacado anteriormente, as plantas do evento T4 foram as que apresentaram melhor desempenho frente à infecção bacteriana, pelo menos com relação aos efeitos da severidade de sintomas nas folhas. Durante todo o experimento os indivíduos em T4 apresentaram uma severidade de sintomas reduzida, chegando a ser até 30 % menor que a severidade verificada nas folhas das plantas selvagens, uma diferença que se mostrou altamente significativa.

Quando foi avaliada a incidência de sintomas nas folhas, claramente foi verificado um melhor desempenho entre as plantas dos eventos transgênicos. Durante todo o experimento, ou seja, em 37, 45, 53 e 64 DAI, foi verificado que as plantas selvagens apresentaram uma incidência de sintomas significativamente superior à maioria dos eventos de transformação avaliados.

Os eventos T1, T3, T4 e T5 apresentaram menor incidência de sintomas em todos os períodos de avaliação, entretanto o evento T2 apresentou incidência similar às plantas selvagens em quase todo o experimento, apenas apresentando menor incidência em 45 DAI (Figura 29).

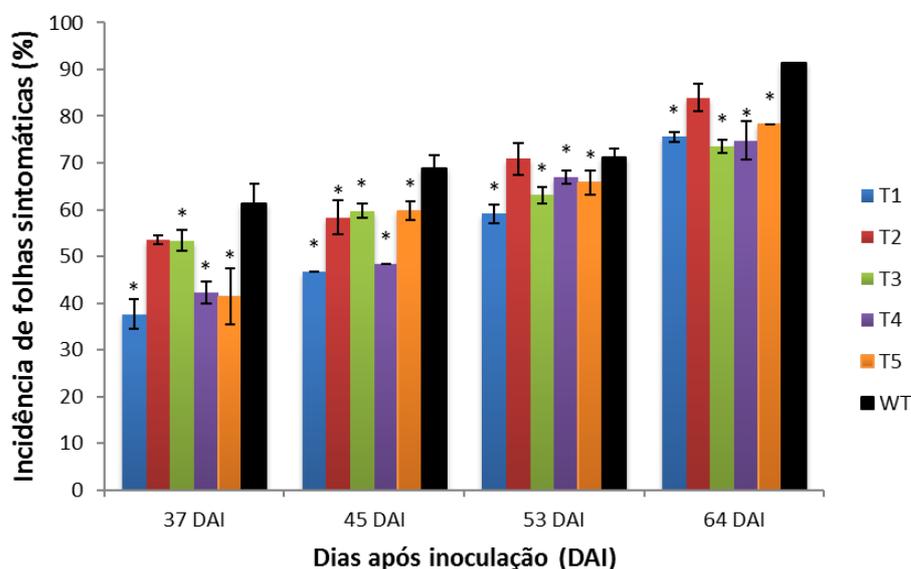


Figura 29 – Incidência de sintomas nas folhas de *N. tabacum* selvagens e transgênicos dos eventos T1, T2, T3, T4 e T5. Os valores representam a média entre 3 avaliadores em 37, 45, 53 e 64 DAI. As barras representam o desvio-padrão entre as avaliações e * mostra os tratamentos com diferença significativa entre as médias em relação às plantas selvagens (WT) em cada período de avaliação ($p < 0,05$).

Em 37 DAI, a menor incidência de sintomas em T1, T4 e T5 foi claramente visível e distinguível das plantas selvagens WT, bem como das plantas dos eventos T2 e T3 (Figura 30).



Figura 30 – Painel apresentando diferenças entre as plantas quanto à incidência de folhas sintomáticas nas plantas de *N. tabacum* selvagem e transgênicas superexpressando EFR. É possível observar que as plantas em T1, T4 e T5 apresentam uma incidência de folhas sintomáticas menor quando comparado às plantas selvagens (WT) ou aos eventos T2 e T3 em 37 DAI.

A curva de progressão da doença foi também determinada a partir dos dados de incidência e novamente foi verificado que a proporção de doença foi mais reduzida nas plantas transgênicas. Por estas análises, todos os eventos apresentaram índice de incidência da doença significativamente reduzido em relação às plantas selvagens, inclusive com diferenças altamente significativas nos eventos T1, T3, T4 e T5 (Figura 31).

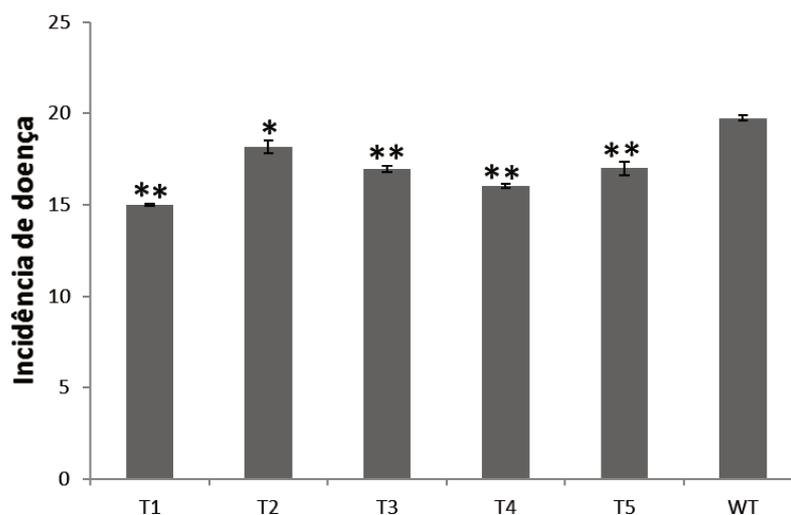


Figura 31 -Progressão da incidência de doença causada por *X. fastidiosa* em *N. tabacum* selvagem (WT) e transgênicas superexpressando *AtEFR* ao longo de 64 dias de infecção. T1, T2, T3, T4 e T5 referem-se aos eventos transgênicos de tabaco. AACPD obtido a partir da incidência de folhas sintomáticas em 37, 45, 53 e 64 DAI. Valores são as médias das áreas de todas as plantas em cada tratamento determinadas por 3 avaliadores. As barras representam o desvio-padrão entre as médias e ** representa diferença altamente significativa em relação às plantas selvagens (WT) considerando todo o período de avaliação ($p < 0,01$).

Ao longo dos 64 dias de infecção com *Xylella fastidiosa*, a incidência de sintomas foi estatisticamente reduzida em todos os eventos de tabaco superexpressando EFR. Com uma redução significativa de quase 25 % na incidência de sintomas, as plantas do evento T1 foram as que apresentaram melhor desempenho ao longo de todo o experimento em relação às plantas selvagens (WT).

Os eventos T1, T4 e T5 que apresentaram menor incidência de sintomas foram também os eventos que apresentaram maior quantidade de ROS produzidas quando desafiadas com peptídeo elf18_{xf}, sugerindo que o reconhecimento deste peptídeo e sinalização mediada por ROS foram importantes para que as plantas apresentassem uma menor incidência de sintomas.

Os resultados indicam que as plantas transgênicas T1, T3, T4 e T5 reconheceram a bactéria *X. fastidiosa* de modo efetivo através da percepção do peptídeo elf18_{xf}, o que foi demonstrado pela intensidade superior de ROS produzido por estas plantas quando comparadas com as plantas controles não-transformadas.

A maior sinalização decorrente da eficiência de percepção de PAMP de *X. fastidiosa* atribuída pelo receptor EFR conferiu menor incidência de sintomas em todos os eventos transgênicos que reconheceram elf18_{Xf}. Apesar de alguns eventos transgênicos terem apresentado severidade de sintomas similar às plantas controle não-transformadas, como é o caso de T3 e T5, além de T2 que possivelmente não teve o reconhecimento aumentado pela presença de EFR, nos eventos T1 e T4 as plantas foram as que apresentaram folhas com menor severidade e incidência de sintomas. Nestes dois eventos (T1 e T4), o percentual de redução de sintomas em relação às plantas WT foi superior a 20 %, o que representa um número bastante expressivo.

Foi verificado que a presença do receptor EFR foi importante na redução de sintomas nas plantas transgênicas de tabaco. Enquanto a redução de severidade de sintomas foi demonstrada apenas nas plantas dos eventos T1 e T4, a redução na incidência de sintomas foi verificada em quatro dos cinco eventos avaliados (T1, T3, T4 e T5). Em T2, aparentemente a funcionalidade de EFR é prejudicada, visto que não apresentou diferença significativa das plantas selvagens em nenhum tempo avaliado, seja nas análises de incidência ou severidade. Além disso, outra característica que sugere problemas na funcionalidade de EFR é a baixa de produção de ROS em presença de elf18 de *E. coli* ou *X. fastidiosa* (Figura 25).

O receptor EFR possivelmente contribuiu para que plantas transgênicas reconhecessem mais rapidamente a presença da bactéria e ativassem respostas PTI de modo mais eficiente para combater a infecção bacteriana. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, o desencadeamento das respostas PTI levaram a redução dos sintomas nas plantas transgênicas possivelmente por impedir a colonização sistêmica da bactéria.

6. DISCUSSÃO

O sistema de imunidade inata desencadeado pelo reconhecimento de PAMPs representa uma etapa crucial no desencadeamento de respostas de defesa e, pelos PRRs serem os responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e ativação dos eventos de sinalização molecular, são fundamentais para as respostas de defesa dos hospedeiros. Neste trabalho foi considerada a hipótese de que a suscetibilidade observada entre espécies de plantas como laranja doce (*C. sinensis*) e tabaco (*N. tabacum*) à infecção por *X. fastidiosa* poderia estar relacionada com ausência ou ineficiência de receptores de membrana específicos para o reconhecimento de PAMPs dessa bactéria. E por ter sido verificado que, *in vitro*, uma região específica da proteína EF-Tu de *X. fastidiosa* (elf18_{xf}) foi capaz de elicitar resposta de defesa PTI em *Arabidopsis* (KUNZE et al., 2004), neste trabalho foi avaliado (*in vitro* e *in vivo*) o papel do EFR no reconhecimento de PAMP desta bactéria e ativação de respostas de defesa PTI.

Já foi bastante demonstrado que *Arabidopsis* é eficiente na elucidação de patogenicidade de várias espécies de bactérias, fungos, vírus ou oomicetos (CARR & WHITHMAN, 2007; OLIVA ET AL. 2010; THATCHER et al., 2005). A susceptibilidade de *Arabidopsis* à *X. fastidiosa* também já havia sido demonstrada e o perfil de crescimento bacteriano verificado pelos autores foi bastante similar ao observado neste trabalho, inclusive na quantidade de bactéria quantificada nos tecidos (ROGERS, 2012). Os resultados apresentados por Rogers (2012) também demonstraram que os genes *rpfF* e *ToIC* são importantes para o crescimento e patogenicidade da bactéria na interação com *Arabidopsis*, visto que a população de *X. fastidiosa rpfF*- apresentou crescimento reduzido e no caso das mutantes *tolC*- nenhuma célula viável foi detectada. Apesar da susceptibilidade, a infecção de *X. fastidiosa* também fez com que *A. thaliana* aumentasse a expressão de genes das vias de JA e ET e diminuísse a expressão de genes da via do SA, mostrando que a planta ativa a regulação da expressão de genes de defesa para tentar impedir a infecção bacteriana (ROGERS, 2012).

Neste trabalho foram identificadas alterações morfológicas nas folhas, como murcha, despigmentação, clorose e arroxamento que podem estar associadas com a infecção da *X. fastidiosa* nos tecidos de *Arabidopsis*. Embora ainda não tenham sido caracterizados sintomas em *Arabidopsis* pela infecção por *X.*

fastidiosa, as alterações destacadas já foram evidenciadas nestas plantas como sintomas pela infecção com outros patógenos e, além disso, alguns dos sintomas também são associados a infecção de *X. fastidiosa* em outras espécies de plantas (YANG & HO, 1998; HYMENO et al., 2014; JANSE & OBRADOVIC, 2010). Entretanto, mesmo que as alterações tenham sido mais evidentes nas plantas infectadas com *X. fastidiosa*, principalmente em início de infecção, estudos mais aprofundados podem ser necessários visto que as alterações também são evidenciadas como um processo natural de senescência pela degradação programada de órgãos e componentes do organismo que são dependentes da idade (WOO et al., 2013). A avaliação das plantas de *A. thaliana* com expressão silenciada de *EFR* neste trabalho demonstrou que a ausência do receptor prejudicou o reconhecimento de *X. fastidiosa* e as respostas de defesa da planta, visto que a sinalização mediada por ROS foi reduzida e foi verificado um significativo aumento na população bacteriana e na colonização desta no xilema das plantas mutantes, o que resultou inclusive no aumento da incidência das alterações que aqui designamos como sintomas. Neste caso, os sintomas foram evidenciados em maior frequência nas plantas mutantes *efr*- em início de infecção, sugerindo que o receptor EFR apresenta importância em algum processo biológico que permite às plantas atrasar o aparecimento dos sintomas destacados. Entretanto, a bactéria conseguiu se manter e inclusive aumentar sua população em ambas as plantas selvagens e mutantes *efr-1* de *Arabidopsis*, o que demonstra que a *X. fastidiosa* apresenta mecanismos de patogenicidade que permitem à bactéria suplantar as respostas de defesa inclusive das plantas selvagens.

A engenharia genética representa uma importante tecnologia que permite a incorporação de características de interesse em diversas espécies de plantas e representa uma estratégia pertinente e com potencial para ser utilizada em plantas cultivadas se considerar os gargalos associados com o melhoramento clássico, como a introdução de características indesejadas que são obtidas a partir dos cruzamentos direcionados (RONALD, 2011). O gene EFR, que até o momento apenas foi identificado em espécies de Brassicaceae, tem sido destacado como um alvo interessante para ser explorado em processos de biotecnologia, visto que as plantas transgênicas expressando EFR foram capazes de apresentar maior resistência a um grande número de bactérias patogênicas. A expressão de EFR foi capaz de conferir percepção à proteína EF-Tu em espécies de plantas de

Solanaceae como *Nicotiana benthamiana* e tomate (*Solanum lycopersicum*), tornando-as mais resistentes a uma gama de bactérias fitopatogênicas de diferentes gêneros (LACOMBE et al., 2010). Além disso, o aumento de resistência foi verificado inclusive quando o EFR foi transferido para espécies de plantas monocotiledôneas de arroz e trigo, demonstrando que apesar do longo tempo de divergência (mais de 140 milhões de anos), a sinalização das respostas PTI desencadeadas pelo reconhecimento de EF-Tu é mantida entre espécies de mono e dicotiledôneas (CHANG et al., 2004; SCHWESSINGER et al., 2015; SCHOONBEEK et al., 2015; LU et al., 2015).

Neste trabalho, foram identificados 20 eventos independentes de plantas transgênicas de tabaco (*N. tabacum*) apresentando 35S::EFR-GFP-His inserido no genoma. Entretanto, em apenas sete desses eventos foi verificada a expressão do transgene *EFR* em nível de transcrito e proteína. Diversos fatores relacionados com a dinâmica da regulação da expressão gênica podem estar envolvidos com a ausência ou diferenças na expressão de *EFR* entre os transformantes, como modificações ou remodelamento da cromatina, o número e posição de cópias do transgene inseridas no genoma ou alguma interferência por exemplo na regulação de processos associados com alongação, transcrição e modificações pós-transcricionais (ORDIZ et al., 2002). O nível de expressão gênica de *EFR* não se relacionou com o nível de resistência observada entre os eventos transgênicos de tabaco desafiados com a *X. fastidiosa*. Em estudos envolvendo a transferência do PRR Xa21 exclusivo de arroz para banana (*Musa sp.*) os autores também verificaram ausência de relação entre o nível de expressão do transgene e a variação de resistência das plantas à bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (TRIPATHI et al., 2014).

Neste trabalho foi verificado que o *AtEFR* superexpresso em eventos transgênicos independentes de tabaco foi capaz de conferir resposta ao elf18 e aumentar a resistência das plantas contra *X. fastidiosa*. Apesar da severidade de sintomas ter sido estatisticamente menor apenas em um dos eventos transgênicos (T4), uma menor incidência de folhas sintomáticas foi verificada em todos os eventos transgênicos que reconheceram elf18 como peptídeo elicitor. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, os resultados sugerem que a expressão de EFR restringiu a colonização bacteriana nas proximidades do ponto de inoculação, visto que um maior número de folhas assintomáticas foi verificado em região mais distal e

próxima ao ápice da planta. Embora tenha sido utilizado na construção o promotor constitutivo 35S que garante expressão temporal e tecido independente, deve-se considerar que a bactéria precisa apresentar uma grande quantidade de EF-Tu para ser reconhecida pelo receptor EFR (KUNZE et al., 2004). Assim, é sugerido que inicialmente a bactéria infectou as plantas selvagens e transgênicas de uma forma similar até que a bactéria desenvolvesse uma quantidade grande de células em biofilme maduro. Em biofilme maduro, a *X. fastidiosa* deve ter produzido EF-Tu em uma quantidade suficiente para ser reconhecida pelo EFR das plantas e ativar os mecanismos de sinalização envolvidos com as respostas de defesa da planta. E com a sinalização ativada nas plantas transgênicas, a população bacteriana ficaria restrita nas proximidades do ponto de inoculação e causando maior severidade de sintomas nas folhas dessa região, o que explicaria a alta severidade de sintomas verificada inclusive nas plantas transgênicas, e também explicaria a menor incidência de sintomas nas plantas transgênicas, visto que as folhas distantes do ponto de infecção foram menos afetadas.

Em *Arabidopsis*, após a ligação de EFR com proteínas da família SERK (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*), incluindo SERK3/BAK1 e SERK4/BKK1, é desencadeada uma intensa e bem caracterizada produção de ROS como resposta inicial da sinalização relacionada com PTI (ROUX et al., 2011). A maior produção de ROS verificada nas plantas transgênicas de tabaco demonstrou que a superexpressão de EFR conferiu sensibilidade aos anteriormente não reconhecidos elf18 de *E. coli* (elf18_{Ecoli}), de *X. fastidiosa* (elf18_{xf}) e de *X. citri* (elf18_{xcc}) e ativou sinalização para as respostas PTI. Os eventos transgênicos de tabaco apresentaram intensidades e tempos diferentes na resposta de sinalização mediada por ROS para cada peptídeo sintético elf18 e, da mesma forma que os resultados observados com expressão genica, não houve relação entre a intensidade de ROS produzida e o nível de resistência das plantas transgênicas superexpressando *EFR*. Esses resultados demonstram que, apesar da produção de ROS ser importante na sinalização para a defesa contra *X. fastidiosa*, o controle da produção de ROS também é importante e uma quantidade acima da necessária não necessariamente confere maior resistência à planta. Tem sido verificado que a quantidade de ROS pode atuar de modo prejudicial ou benéfico dependendo de um delicado equilíbrio entre sua produção e eliminação e, dessa forma, a concentração de ROS deve ser controlada na célula (GIL & TUTEJA, 2010). Por causa dos múltiplos papéis

funcionais de ROS, é necessário que as células controlem de modo preciso os níveis de ROS para evitar qualquer dano oxidativo, como peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas ou danos a ácidos nucleicos, mas também estes (ROS) não podem ser eliminados completamente por se tratar de moléculas que apresentam efeitos protetivos por exemplo como mensageiros secundários na sinalização intracelular contra os diferentes tipos de estresse biótico ou abiótico (SHARMA et al., 2012). A resposta mais rápida e mais intensa associada com a produção de ROS nas plantas transgênicas de tabaco quando tratadas com elf18_{Ecoli} sugere uma maior especificidade na ligação do EFR com este ligante do que com os peptídeos sintéticos de *X. fastidiosa* (elf18_{Xf}) ou de *X. citri* (elf18_{Xcc}). Por sua vez, o peptídeo elf18_{Xcc} desencadeou uma resposta mais rápida e intensa de ROS nas plantas de tabaco quando comparado com elf18_{Xf}, sugerindo que a maior similaridade com a sequência elf18_{Ecoli} é importante e aumenta a eficiência no reconhecimento pelo PRR. Da mesma forma, a expressão de EFR em arroz também conferiu elevada produção de ROS quando tratadas com elf18 de *Xanthomonas oryzae oryzae* (Xoo) que apresenta elf18 idêntico ao elf18_{Xcc} (SCHWESSINGER et al., 2015). Enquanto elf18_{Xcc} e elf18_{Xoo} apresentam alteração em apenas dois aminoácidos quando comparados com a sequência de elf18_{Ecoli}, em elf18_{Xf} são observados cinco aminoácidos alterados o que pode explicar o atraso no reconhecimento e a menor intensidade de ROS produzida. Embora os PRRs tenham evoluído para reconhecer epítomos conservados, os MAMPs de algumas espécies ou linhagens de microrganismos podem divergir suficientemente a ponto de prejudicar ou mesmo impossibilitar seu reconhecimento (HELFT et al., 2016). E da mesma forma, alguns PRRs também podem evoluir de modo distinto entre as espécies de hospedeiros e reconhecer outros PAMPs ou mesmo reconhecer uma outra região em um mesmo PAMP. Enquanto os 18 primeiros aminoácidos da região N-terminal de EF-Tu (elf18) não desencadeiam nenhuma atividade elicitora em arroz, uma outra região de 50 aminoácidos de EF-Tu, compreendida entre Lys176 e Gly225 e denominada pelos autores como Efa50, conferiu elevada atividade elicitora, demonstrando o reconhecimento desta outra região de EF-Tu como PAMP em arroz (FURUKAWA et al., 2014).

Genes-R de resistência também têm sido bastante explorados em programas de melhoramento clássico ou utilizados pela engenharia genética como alvos para conferir resistência às plantas. Entretanto, é bem conhecido que os

organismos patogênicos podem evoluir e “quebrar” a resistência genética apresentada pelas plantas. Nesse contexto, tem sido demonstrado que a resistência conferida pelos Genes R que são específicos contra linhagens específicas de patógenos não é durável, visto que o agente patogênico pode rapidamente evoluir mecanismos para superar a resistência da planta (FRY, 2008; HAAs et al., 2009). Em contrapartida, tem sido também sugerido que a utilização de PRRs permite conferir resistência duradoura e de largo espectro, o que pode ser atribuído ao fato de que o conservado PAMP reconhecido pelo PRR é, por definição, essencial para o fitness microbiano. Assim, o patógeno não poderia simplesmente superar a resistência da planta através de mutação da molécula ou estrutura reconhecida pelo PRR da planta. Além disso, como os MAMPs/PAMPs são conservados e compartilhados entre classes de microrganismos, a introdução de novos receptores de PAMPs permite conferir resistência contra uma ampla gama de patógenos. Entretanto, por ter o conhecimento de que a imunidade PTI mediada por PRR é passível de ser suprimida através da produção de efetores por parte do patógeno, não é possível prever se o comportamento de resistência que foi mediada pelo EFR nas plantas transgênicas de tabaco à *X. fastidiosa* será duradouro (DODDS & RATHJEN, 2010).

7. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2

- A inoculação de *X. fastidiosa* em *A. thaliana* permitiu a caracterização de sintomas relacionados à presença da bactéria nos tecidos, os quais estão relacionados com murcha, despigmentação, clorose e arroxamento de folhas da roseta.

- O receptor EFR mostrou-se importante na redução de colonização de *X. fastidiosa* nos tecidos de *A. thaliana* e também na diminuição de incidência e severidade de sintomas em períodos iniciais de infecção.

- Foi demonstrado o envolvimento do receptor EFR na sinalização de defesa mediada por ROS em *A. thaliana* infectadas com *X. fastidiosa*.

- O reconhecimento de EF-Tu de *X. fastidiosa* como PAMP destaca o potencial uso de EFR em conferir maior resistência à bactéria em espécies susceptíveis.

- Os trabalhos relacionados com a transferência de EFR para *N. tabacum* permitiram verificar uma grande diferença na expressão de EFR entre os eventos transgênicos e, além disso, a detecção da expressão da proteína EFR por *western blott* associado a maior produção de ROS nas folhas das plantas transgênicas em presença elf18 de *E. coli* validaram o processo de transformação e da transferência do sistema de percepção de PAMP baseado no receptor EFR.

- Alguns eventos de plantas transgênicas F1 de *N. tabacum* desafiadas com a linhagem 9a5c *X. fastidiosa* apresentaram uma resposta mais efetiva contra a infecção causada pela *X. fastidiosa* quando comparado com as plantas selvagens, o que pode ser verificado principalmente pela menor incidência de sintomas.

8. CONSIDERAÇÕES GERAIS DO CAPÍTULO 2

A maior produção de ROS nas plantas transgênicas em decorrência do peptídeo elf18 de *X. fastidiosa* demonstrou o reconhecimento do peptídeo e consequente ativação de resposta de imunidade PTI. Esses dados sugerem que *in vivo*, a bactéria *Xylella fastidiosa* é reconhecida de modo mais eficiente (mais rapidamente) o que possivelmente foi importante na contenção do processo infeccioso. Além disso, o reconhecimento também associado ao peptídeo elf18 de *Xanthomonas citri* *subsp. citri* sugere a possibilidade de se expandir a percepção para outras bactérias (*broad spectrum*), o que seria de grande interesse para citricultura considerando o impacto das doenças bacterianas para o agronegócio.

9. REFERÊNCIAS

AFROZ, A. et al. Enhanced resistance against bacterial wilt in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) lines expressing the Xa21 gene. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, v. 104, n. 2, p.227-237, 25 ago. 2010. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s11240-010-9825-2>.

ALMEIDA, R.P.P.; et al. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v.85, p.382-386, 2001.

ALMEIDA, R.P.P.; NUNNEY, L. How Do Plant Diseases Caused by *Xylella fastidiosa* Emerge? **Plant Disease**, v. 99, n. 11, p.1457-1467, nov. 2015. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-02-15-0159-fe>.

ALONSO, J.M. et al. Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Science**, v. 301, n. 5633, p.653-657, 1 ago. 2003. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1086391>.

ALVES, E. et al. Citrus sinensis leaf petiole and blade colonization by *Xylella fastidiosa*: details of xylem vessel occlusion. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**, v. 66, n. 2, p.218-224, abr. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162009000200011>.

BACCARI, C.; LINDOW, S.E. Assessment of the Process of Movement of *Xylella fastidiosa* Within Susceptible and Resistant Grape Cultivars. **Phytopathology**, v. 101, n. 1, p.77-84, jan. 2011. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto-04-10-0104>.

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso da doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de fitopatologia. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, cap. 30, p.602-626.

BOVÉ, J.M.; AYRES, A.J. Etiology of three recent diseases of citrus in São Paulo State: Sudden Death, Variegated Chlorosis and Huanglongbing. **IUBMB Life**, Oxford, v.59, n. 4/5, p.346-354, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRASILEIRO, A.C.M. Co-cultura com linhagens desarmadas de *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A C. M.; CARNEIRO, V. T. de C (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; EMBRAPA- CENARGEN, p.309, 1998.

BRUTUS, A.; HE, S.Y. Broad-spectrum defense against plant pathogens. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 4, p.330-331, abr. 2010. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0410-330>.

CASERTA, R. et al. Expression of *Xylella fastidiosa* Fimbrial and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.4250-4259, 2010.

CEPEA. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pib/>. Acesso em 14 de setembro de 2012.

CHANG, S.M. et al. Dating the Monocot-Dicot Divergence and the Origin of Core Eudicots Using Whole Chloroplast Genomes. **Journal Of Molecular Evolution**, v. 58, n. 4, p.424-441, 1 abr. 2004. Springer Science + Business Media. <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-003-2564-9>.

CHATTERJEE, S.; WISTROM, C.; LINDOW, S.E. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.105, p.2670-2675, 2008.

DAUDI, A. et al. The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in *Arabidopsis* Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity. **The Plant Cell**, v. 24, n. 1, p.275-287, 1 jan. 2012. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.093039>.

DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v.6, p.309-314, 1981. doi: 10.1007/BF01566883.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

FINN, R.D. et al. SAMMUT, S.J. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res**, v.36, p.281-288, 2008.

FRANCIS, M.; CIVEROLO, E. L.; BRUENING, G. Improved Bioassay of *Xylella fastidiosa* Using *Nicotiana tabacum* Cultivar SR1. **Plant Disease**, v. 92, n. 1, p.14-20, jan. 2008. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-92-1-0014>.

FRY, W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 3, p.385-402, maio 2008. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>.

FUNDECITRUS. Fundo de defesa da Citricultura. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/cancrocitrico,327>. Acesso em 20 de Dezembro de 2012.

FURANO, A.V. Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 72 4780–4784 10.1073/pnas.72.12.4780, 1975.

FURUKAWA, T. et al. Two Distinct EF-Tu Epitopes Induce Immune Responses in Rice and Arabidopsis. **Mpmi**, v. 27, n. 2, p.113-124, fev. 2014. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-10-13-0304-r>.

GANAPATHI, T.R. et al. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. **Indian Journal of Biotechnology**, v.3, p.171-184, 2004.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 48, n. 12, p.909-930, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.

GOMEZ-GOMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. **Mol Cell**, v.5, p.1003-1011, 2000.

GRANATO, D. et al. Cell Surface-Associated Elongation Factor Tu Mediates the Attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to Human Intestinal Cells and Mucins. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 4, p.2160-2169, 23 mar. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.4.2160-2169.2004>.

GREEFF, C. et al. Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. **Frontiers in Plant Science Plant Proteomics**, v.3, august, 2012.

HAAS, B.J. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. **Nature**, v. 461, n. 7262, p.393-398, 9 set. 2009. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08358>.

HELFT, L.; THOMPSON, M.; BENT, A.F. Directed Evolution of FLS2 towards Novel Flagellin Peptide Recognition. **Plos One**, v. 11, n. 6, p.1-19, 6 jun. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0157155>.

HENDERSON, I.R. et al. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p.692-744, 1 dez. 2004. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mnbr.68.4.692-744.2004>.

HILL, B.L.; PURCELL, A.P. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, v. 85: p. 1368-1372, 1995.

HOPKINS, D.L. *Xylella Fastidiosa*: Xylem-Limited Bacterial Pathogen of Plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 27, n. 1, p.271-290, set. 1989. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001415>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_imprensa.php?id_noticia=2001. Acesso em 20 de Dezembro de 2012.

JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**, v.444, p.323-329, 2006. doi:10.1038/nature05286.

KJELDGAARD, M.; NYBORG, J. Refined structure of elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli*. **Journal Of Molecular Biology**, v. 223, n. 3, p.721-742, fev. 1992. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90986-t](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(92)90986-t).

KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal**, v.61, p.909-921, 2010.

KUNZE, G. et al. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. **Plant Cell**, v.16, p.3496-3507, 2004.

LACOMBE, S. et al. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 4, p.365-369, 14 mar. 2010. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1613>.

LACORTE, C. β -Glucuronidase. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA, SPI, cap.8, p.127-141, 1998.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. (Org). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: SPI/Embrapa, 1998. V.1, p.93-109.

LAEMMLI, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 15;227(5259):680-5, 1970.

LATHE, W.C.; BORK, P. Evolution of tuf genes: ancient duplication, differential loss and gene conversion. **Febs Letters**, v. 502, n. 3, p.113-116, 1 ago. 2001. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02639-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02639-4).

LEITE, R.M.V.B.C.; LEITE-JUNIOR, R.P.; CEREZINE, P.C. Flutuação populacional de *Xylella fastidiosa* em ameixeiras suscetíveis e resistentes à escaldadura da folha. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.58-63, 1997.

LINDOW, S. et al. Production of *Xylella fastidiosa* Diffusible Signal Factor in Transgenic Grape Causes Pathogen Confusion and Reduction in Severity of Pierce's Disease. **Mpmi**, v. 27, n. 3, p.244-254, mar. 2014. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-07-13-0197-fi>.

LI, Y. et al. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation, and cell-cell aggregation. **Microbiology**, v.53, p.719-726, 2007.

LOPES, S.A. et al. *Nicotiana tabacum* as an Experimental Host for the Study of Plant-*Xylella fastidiosa* Interactions. **Plant Disease**, v. 84, n. 8, p.827-830, ago. 2000. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2000.84.8.827>.

LU, F. et al. Enhancement of innate immune system in monocot rice by transferring the dicotyledonous elongation factor Tu receptor EFR. **Journal Of Integrative Plant Biology**, v. 57, n. 7, p.641-652, 13 jan. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.12306>.

LUCAS, J.A. Plant Pathology and Plant Pathogens. 3rd ed.; Blackwell, **Science**, 1998.

MACKEY, D.; McFALL, A.J. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. **Mol Microbiol.**, v.61, p.1365-1371, 2006.

MARQUES, J.P.R. et al. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.1531-1536, 2007.

McELRONE, A.J.; SHERALD, J.L.; FORSETH, I.N. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. **Journal Of Experimental Botany**, v. 54, n. 381, p.419-430, 2 jan. 2003. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erg046>.

MEINKE, D.W. et al. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. **SCIENCE**, v.282, p.662-682, 1998.

MENDES, B.M.J. et al. A. Reduction in susceptibility to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in transgenic *Citrus sinensis* expressing the rice *Xa21* gene. **Plant Pathology**. Bristol. doi: 11111/j.1365-3059.2009.02148.x.

MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 15, n. 4, p.349-357, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>.

MORGENSTERN, B. DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. **Bioinformatics**, v.15, p.211-218, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.

NASCIMENTO, R. et al. The Type II Secreted Lipase/Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for *Xylella fastidiosa* Pathogenesis in Grapevines. **Sci. Rep.**, v. 6, p.1-16, 12 jan. 2016. Nature Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.1038/srep18598>.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F. **Estratégias para laranja no Brasil**. 1. ed. São Paulo: Atlas, p.225, 2005.

NEVES, M.F. et al. **O retrato da citricultura brasileira**, São Paulo: CitrusBR, p.138, 2011.

NEWMAN, K.L. et al. Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of *Xylella fastidiosa* Colonization of *Vitis vinifera*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p.7319-7327, 1 dez. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.12.7319-7327.2003>.

NIZA, B. et al. Differential colonization patterns of *Xylella fastidiosa* infecting citrus genotypes. **Plant Pathology**, v. 64, n. 6, p.1259-1269, 29 abr. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12381>.

NÜRNBERGER, T.; BRUNNER, F. Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.318-324, 2002.

NURNBERGER, T. et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunol Rev**, v. 198, n. 1, p.249-266, abr. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0119.x>.

OLIVEIRA, A.L.M. et al. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant Soil**, v.242, p.205-215, 2002.

OLIVER, J.E. et al. Ionome Changes in *Xylella fastidiosa* –Infected *Nicotiana tabacum* Correlate With Virulence and Discriminate Between Subspecies of Bacterial Isolates. **Mpmi**, v. 27, n. 10, p.1048-1058, out. 2014. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-05-14-0151-r>.

PALMER, S.O. et al. Cloning and Characterization of EF-Tu and EF-Ts from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-12, 2013. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/585748>.

PEREIRA, W.E.L. **Uso de *Nicotiana tabacum* e *Arabidopsis thaliana* como plantas modelo para o estudo funcional de genes associados à resistência a clorose variegada dos citros**. 90f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de *Campinas*, Campinas, 2014.

PURCELL, A.H. HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, p.31-151, 1996.

PURCELL, A. Paradigms: Examples from the Bacterium *Xylella fastidiosa*. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 51, n. 1, p.339-356, 4 ago. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102325>.

REDDY, J.D. et al. TolC is Required for Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* Grapevines. **Mpmi**, v. 20, n. 4, p.403-410, abr. 2007. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-20-4-0403>.

RETCHLESS, A. et al. Genomic insights into *Xylella fastidiosa* interactions with plant and insect hosts, p. 177–202, 2014. In Gross DC, Lichens-Park A, Kole C (ed), *Genomics of plant-associated bacteria*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

RODNINA, M.V. et al. Recognition and selection of tRNA in translation. **Febs Letters**, v. 579, n. 4, p.938-942, 28 nov. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.048>.

ROGERS, E.E. Evaluation of *Arabidopsis thaliana* as a model host for *Xylella fastidiosa*. **MPMI**, v.25, p.747-754, 2012.

RONALD, P. Plant Genetics, Sustainable Agriculture and Global Food Security. **Genetics**, v. 188, n. 1, p.11-20, 1 maio 2011. Genetics Society of America. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.111.128553>.

ROPER, M.C. et al. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* *in vitro* and *in planta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.7252-7258, 2007.

ROUX, M. et al. 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**, v.23, p.2440-2455, 2011.

SAKAMOTO, T. et al. The tomato RLK superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the LRR-RLK subfamily in antiviral defense. **BMC Plant Biology**, v.12, 229, doi:10.1186/1471-2229-12-229, 2012.

SALOMON, D.; SESSA, G. Biotechnological strategies for engineering plants with durable resistance to fungal and bacterial pathogens. In: **Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century**, n.1, 2012.

SAPONARI, M. et al. Infectivity and Transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. **Journal Of Economic Entomology**, v. 107, n. 4, p.1316-1319, 1 ago. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1603/ec14142>.

SCHOONBEEK, HJ. Et al. Arabidopsis EF-Tu receptor enhances bacterial disease resistance in transgenic wheat. **New Phytologist**, v. 206, n. 2, p.606-613, 11 mar. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.13356>.

SCHWESSINGER, B.; RONALD, P.C. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. **Annual Review Of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p.451-482, 2 jun. 2012. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105518>.

SCHWESSINGER, B. et al. Transgenic Expression of the Dicotyledonous Pattern Recognition Receptor EFR in Rice Leads to Ligand-Dependent Activation of Defense Responses. **Plos Pathog**, v. 11, n. 3, p.1-34, 30 mar. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004809>.

SEEM, R.C. Disease Incidence and Severity Relationships. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 22, n. 1, p.133-150, set. 1984. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.py.22.090184.001025>.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal Of Botany**, v. 2012, p.1-26, 2012. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/217037>.

SHIU S.H. et al. Comparative analysis of the receptor-like Kinase family in Arabidopsis and rice. **Plant Cell**, v.16, p.1220-1234, 2004.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, p.10763-10768, 2001.

SILVA, M.S. et al. Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*. **Proteome Science**, v.9, p.1-10, 2011.

SIMPSON, A.J. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, p.151-157, 2000.

SONG, W.Y. et al. A Receptor Kinase-Like Protein Encoded by the Rice Disease Resistance Gene, Xa21. **Science**, v. 270, n. 5243, p.1804-1806, 15 dez. 1995. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.270.5243.1804>.

SOUFO, H.J.D. et al. Translation Elongation Factor EF-Tu Modulates Filament Formation of Actin-Like MreB Protein In Vitro. **Journal Of Molecular Biology**, v. 427, n. 8, p.1715-1727, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.01.025>.

SU, C.C. et al. Pierce's Disease of Grapevines in Taiwan: Isolation, Cultivation and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. **J Phytopathol**, v. 161, n. 6, p.389-396, 21 jan. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12075>.

SUN, Q. et al. Vascular Occlusions in Grapevines with Pierce's Disease Make Disease Symptom Development Worse. **Plant Physiology**, v. 161, n. 3, p.1529-1541, 4 jan. 2013. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.112.208157>.

SUN, X. et al. Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. **Plant Journal**, v.37, p.517-527, 2004.

SUN, X.; WANG, G.L. Genome-Wide Identification, Characterization and Phylogenetic Analysis of the Rice LRR-Kinases. **PLoS One**, v.6, n.3, e16079, 2011.

TAKESHI, I.; SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: The importance of rice to plant science. **Trends in Plant Science**, v.1, n.3, p.95-99, 1996.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

TANG, X.; XIAO, Y.; ZHOU, J. Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, p.1159-1166, 2006.

THOMMA, B.P.; NURNBERGER, T.; JOOSTEN, M.H. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI- ETI dichotomy. **Plant Cell**, v. 23, p. 4-15, 2011.

THORDAL-CHRISTENSEN, H. et al. Subcellular localization of H₂O₂ in plants, H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during barley-powdery mildew interaction. **Plant Journal**, v.11, p.1187-1194, 1997.

TOPFER, R. et al. A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. **Nucleic Acid Research**, v.15, p.5890, 1987.

TORRES, M.A.; JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. **Plant Physiology**, v. 141, n.2, p. 373-378, 2006.

TRIPATHI, J.N. et al. Transgenic expression of the rice Xa21 pattern-recognition receptor in banana (*Musa sp.*) confers resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum*. **Plant Biotechnol J**, v. 12, n. 6, p.663-673, 25 fev. 2014. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/pbi.12170>.

Van SLUYS, M.A. et al. Comparative Analyses of the Complete Genome Sequences of Pierce's Disease and Citrus Variegated Chlorosis Strains of *Xylella fastidiosa*. **Journal Of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p.1018-1026, 1 fev. 2003. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.185.3.1018-1026.2003>.

WELLS, J.M. et al. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: Gram-Negative, Xylem-Limited, Fastidious Plant Bacteria Related to *Xanthomonas* spp. **International Journal Of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 2, p.136-143, 1 abr. 1987. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-37-2-136>.

XU, Q. et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**, v.45, p.59-66, 2012.

ZHAO, S.; FERNALD, R.D. Comprehensive Algorithm for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Journal Of Computational Biology**, v. 12, n. 8, p.1047-1064, out. 2005. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047>.

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

ZIPFEL, C. et al. Perception of the Bacterial PAMP EF-Tu by the Receptor EFR Restricts Agrobacterium-Mediated Transformation. *Cell*, v. 125, n. 4, p.749-760, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.037>.

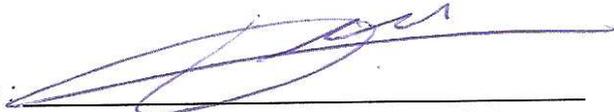
ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends In Immunology**, v. 35, n. 7, p.345-351, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>

APÊNDICE I – DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

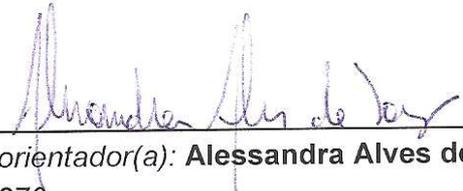
Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

*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 **Análise filogenética de LRR-RLKs em Citrus e o envolvimento do receptor de EF-Tu no reconhecimento de Xylella fastidiosa**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.*

Campinas, 30 de Junho de 2016

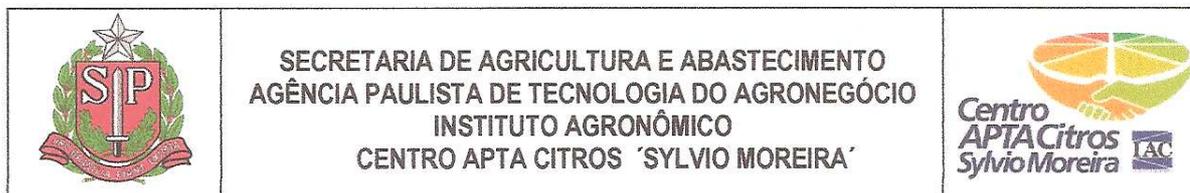
Assinatura : 

Nome do(a) autor(a): **Diogo Maciel de Magalhães**
RG n.º 25235400-X

Assinatura : 

Nome do(a) orientador(a): **Alessandra Alves de Souza**
RG n.º 3533370

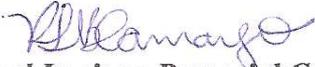
APÊNDICE II – DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA



DECLARAÇÃO DE BIOÉTICA

Eu, Raquel Luciana Boscariol Camargo, presidente da CIBio do Instituto Agrônomo (IAC), o qual possui CQB nº 0065/98, declaro que o projeto “Análise filogenética de LRR-RLKs em *Citrus* e o envolvimento do receptor de EF-Tu no reconhecimento de *Xylella fastidiosa*”, desenvolvido pelo aluno Diogo Maciel de Magalhães, projeto de bolsa Fapesp (2013/01412-0), está sendo desenvolvido dentro das normas de bioética e biossegurança determinadas por essa comissão.

Cordeirópolis, 30 de Junho de 2016.


Dra. Raquel Luciana Boscariol Camargo
 PqC VI - Instituto Agrônomo
 Presidente da CIBio do IAC