



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de  
Botucatu para obtenção do Título de Doutora em  
Genética, na área de concentração Genética Vegetal.

**Expressão diferencial de genes em laranja doce (*Citrus sinensis*  
L. Osb) e em tangerina (*Citrus reticulata* blanco) em resposta à  
infecção por *Xylella fastidiosa***

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Alves de Souza

Aluna: Carolina Munari Rodrigues

Botucatu

Estado de São Paulo, Brasil

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Rodrigues, Carolina Munari.

Expressão diferencial de genes em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb) e em tangerina (*Citrus reticulata* Blanco) em resposta à infecção por *Xylella fastidiosa* / Carolina Munari Rodrigues. – Botucatu : [s. n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Antonio Machado

Co-Orientador: Alessandra Alves de Souza

Capes: 20203004

1. Frutas cítricas – Doenças e pragas. 2. Genética vegetal. 3. Melhoramento genético.

Palavras-chave: CVC; Expressão gênica; Genes de defesa de plantas, RNA-seq; Vias metabólicas.

*"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."*

Galileu Galilei

À minha amada filha, Julia, que veio para iluminar minha vida;

Aos meus pais, Clóvis e Heloisa, pelas incansáveis horas de dedicação, por todo amor, ensinamentos e incentivo;

Ao meu marido Alex por todo apoio, companherismo e amor;

Aos meus irmãos Cláudia e Marcos, por estarem sempre presentes em todos os momentos de minha vida;

À Ellen, Patrícia, Marcelo, Karina, Leoni, Maria e Luis pelo apoio, ajuda e incentivo;

As minhas queridas sobrinhas Gabriela e Luisa

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcos Antonio Machado pela orientação, oportunidade e por acreditar na minha capacidade e no meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço imensamente a Dra. Alessandra Alves de Souza pela co-orientação, amizade e, principalmente por me ensinar a fazer ciência.

Ao Dr. Marco Aurélio Takita, Luciano Kishi e Dr. Helvécio Della Coletta Filho pela ajuda, ensinamentos e auxílio na realização desse trabalho.

Ao departamento de Genética, IBB / Unesp – Botucatu, professores e departamento de Pós-graduação que foram de essencial importância para a realização do trabalho.

À Fapesp pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC e a todos seus funcionários ...

As amigas Marines Bastianel, Raquel Caserta, Mariana S. Silva, Silvia Dorta, Simone, Rosângela, Eliane Locali e Renata Luizon pelo companherismo, conselhos, ajuda e amizade que são muito importantes para mim.

Aos colegas do Grupo Xylella, Juarez, Bárbara, Willian, Nagai e Taís.

Aos colegas da pós-graduação, Danila, Valéria e Joadson, pela ajuda, boa convivência e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, Kleber, Amélia, Luis e Adriano.

Agradeço aos pesquisadores doutores, Mariângela, Maria Luiza, Sérgio, Valdenice, Juliana e Raquel pelo auxílio e atenção.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a concretização desse trabalho.

## Sumário

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Resistência de plantas à patógenos.....	2
2.2. Indução de resistência.....	3
2.3. Mecanismos de sinalização envolvidos nas respostas de interação planta – patógeno.....	5
2.3.1. Percepção do sinal.....	5
2.3.2. Transdução de sinal.....	7
2.3.2.1. Mensageiros secundários.....	8
2.3.2.1.1. Proteína-G.....	8
2.3.2.1.2. Inositol 1,4,5-trifosfato (IP <sub>3</sub> ) e ácido diacilglicerol (DAG).....	9
2.3.2.1.3. Cálcio (Ca <sup>2+</sup> ).....	9
2.3.2.1.4. Espécies ativas de oxigênio (EAO's).....	10
2.3.2.1.5. Óxido nítrico (NO).....	12
2.3.2.1.6. Ácido salicílico (SA).....	13
2.3.2.1.7. Ácido jasmônico (JA) e etileno (ET).....	14
2.3.2.1.8. Auxina.....	17
2.3.3. Tradução de sinal.....	20
2.3.3.1. Proteínas-PR.....	20

2.3.3.2. Fitoalexinas.....	21
2.4. Citros.....	23
2.5. Clorose variegada dos citros (CVC).....	25
2.6. <i>Xylella fastidiosa</i> .....	28
2.7. Citros e a <i>Xylella fastidiosa</i> .....	32
2.8. Análise de expressão gênica.....	33
2.8.1. Hibridação subtrativa supressiva.....	33
2.8.2. Sequenciamento de nova geração.....	37
2.8.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).....	42
3. HIPÓTESE DO TRABALHO.....	44
4. OBJETIVOS.....	44
4.1. Objetivo Geral.....	44
4.2. Objetivos Específicos.....	44
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5.1. Ensaio biológico:.....	45
5.2. Bibliotecas subtrativas supressivas (SSH).....	47
5.3. Transcriptoma por RNA-seq .....	51
5.3.1. Experimento Piloto.....	52
5.3.2. RNAseq de laranja Pera e tangerina Poncan.....	53
5.4. Análise da expressão dos genes candidatos por RT-qPCR.....	54
6. RESULTADOS.....	58
6.1. Monitoramento da população da bactéria.....	58

6.2. Bibliotecas subtrativas supressivas (SSH).....	61
6.3. Transcriptoma de laranja Pera e tangerina Poncan por RNA-seq.....	65
6.4. Análise da expressão dos genes candidatos por RT-qPCR.....	68
7. DISCUSSÃO.....	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
9. ANEXO.....	106



## Resumo

A citricultura brasileira responde por 85% das exportações de suco concentrado do mundo, mesmo enfrentando graves problemas de ordem fitossanitária. Dentre as doenças que mais afetam sua produtividade encontra-se a clorose variegada do citros (CVC), causada pela *Xylella fastidiosa*. Cultivares dentro das espécies de *Citrus* apresentam respostas diferentes em relação à susceptibilidade à CVC. Enquanto cultivares de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osb) são bastante suscetíveis, as tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) por sua vez são consideradas tolerantes. Resultados prévios do nosso grupo sugerem que a resistência deve estar efetivamente envolvida com a ativação de vias de sinalização, não sendo somente consequência de menor bloqueio dos vasos do xilema. Portanto, a hipótese desse trabalho é que a resistência da tangerina Poncan e a suscetibilidade de laranja doce à CVC pode ser comparada através da avaliação da expressão diferencial de genes durante o processo de infecção. Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a expressão de genes dessas duas espécies submetidas à infecção pela bactéria.

Para tanto plantas de laranja Pera e tangerina Poncan foram desafiadas com *X. fastidiosa* e as coletas das folhas infectadas e seus respectivos controles feitas em diferentes tempos (1, 7, 14 e 21 dias). Esse material foi utilizado para extração de DNA total que foi usado na confirmação, por RT-qPCR, da presença da bactéria. Após essa verificação, o RNA foi extraído em *pools* para a construção das bibliotecas subtrativas supressivas (SSHs). Foram feitas seis bibliotecas, porém, não foram obtidas sequências de qualidade.

Em função do baixo rendimento das SSHs, optou-se por proceder as análises com RNA-seq utilizando tecidos xilemáticos de tangerina Poncan, com um dia após infecção com *X. fastidiosa*. Como resultados foram obtidos 35.344.265 sequências da biblioteca não infectada e 37.326.339 da biblioteca infectada. Essas sequências foram mapeadas utilizando o genoma de *Citrus clementine* como referência através do *software TopHat*. Os contigs gerados após essa análise foram utilizados para medir a expressão relativa entre a biblioteca infectada com a *X. fastidiosa* e a biblioteca controle. Após análises no programa Cuffilink, 1.569 transcritos apresentaram variação significativa na expressão, onde 349 foram reprimidos e 225 induzidos, ambos com *fold*  $\geq 1.0$ , nas plantas desafiadas com o patógeno. Os transcritos diferencialmente expressos

identificados na biblioteca infectada foram utilizados nas buscas por proteínas similares no GenBank. Além disso, essas sequências foram automaticamente anotadas e categorizadas de acordo com as classes funcionais do GO (Gene Ontology). Entre os transcritos induzidos, foram encontrados genes relacionados à síntese e organização da parede celular, como celulose sintase e HPT, sugerindo uma defesa física contra a *X. fastidiosa*. Interessantemente, um gene que codifica para uma proteína similar a NBS-LRR também foi expresso indicando a percepção de algum sinal molecular da bactéria que ativa a cascata de sinalização para a expressão de genes de defesa.

Contudo, a resposta mais interessante foi a indução de genes relacionados síntese de auxina, bem como um receptor para esse hormônio. Esses resultados indicam que a planta pode desencadear uma resposta imune via auxina. Outra observação que suporta essa hipótese foi a repressão do gene *expansina*, o que reforça a idéia de que a auxina não está exercendo a função na alongação celular, mas sim como uma ativadora da resposta imune da planta. Adicionalmente, foi encontrado um fator de transcrição, AP2, relacionado à ativação da via do etileno, indicando que essa via também pode ser induzida nas plantas de Poncan, talvez por interação com a via de auxina. Também foi encontrado a indução de genes relacionados à resposta de estresse, como *heat shock*, *peroxidase*, *P450* e outros que estão envolvidos na detoxificação das células.

Para a validação dos resultados do transcriptoma de tangerina Poncan, alguns genes foram avaliados por RT-qPCR. A correlação entre os resultados das duas técnicas foi de 0.84, confirmando os resultados obtidos no RNA-seq.

Adicionalmente, foram avaliados alguns genes relacionados às vias do SA, JA e ET, identificados no CitEST, além de genes selecionados a partir do transcriptoma de Poncan em *time course* nas duas espécies de citros. Antes de iniciar as análises de expressão gênica por RT-qPCR, foram selecionados os melhores normalizadores utilizando o algoritmo geNorm. Os genes avaliados foram  *$\beta$ -tubulina*, *ETEF2*, *ubiquitina*, *EGIDH* e *ciclofilina* (Homólogos em citros). Como resultados, os genes *ubiquitina* e *ciclofilina* foram os que apresentaram maior estabilidade em todas as condições avaliadas. Contudo, foram utilizados os genes *ciclofilina* e *ETEF2*, visto que, eles não apresentaram variações significativas nos níveis de expressão nas análises do transcriptoma de tangerina Poncan (xilema).

Após as análises de expressão gênica em *time course*, a tangerina Poncan apresentou genes induzidos relacionados às vias de auxina, JA e ET nos primeiros tempos avaliados. Aos 21 dias após inoculação com a bactéria, houve uma diminuição

da expressão desses genes, porém, alguns genes da via do SA foram induzidos significativamente. Esses resultados demonstram a dinâmica da resposta de defesa de Poncan durante o processo infeccioso e que parece ser essencial para conferir a resistência dessa espécie de citros contra o ataque de *X. fastidiosa*.

Os resultados observados em laranja doce foram contrários aos de Poncan, onde não foi possível observar ativação das vias de auxina e SA. No entanto, observa-se a indução de genes relacionados às vias de JA/ET, porém muito menor que aquela observada em tangerina. Os resultados desse estudo confirmam a hipótese de que existe expressão diferencial de genes de resposta de defesa entre ambas as espécies à infecção por *X. fastidiosa*. Porém ainda não é possível esclarecer todas as etapas dos mecanismos de interação entre a bactéria e esses genótipos.

**Palavras-chave:** CVC; Expressão gênica; Genes de defesa de plantas, RNA-seq; Vias metabólicas.

## Abstract

The Brazilian citrus industry accounts for 85% of exports of concentrated juice in the world despite facing serious plant health problems. Among the main diseases that affect its productivity is the citrus variegated chlorosis (CVC), caused by *Xylella fastidiosa*. *Citrus* species present different responses in relation to susceptibility to CVC. While sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb) is very susceptible, mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) is considered tolerant. Previous results from our group suggest that this tolerance observed in mandarin effectively involves activation of signaling pathways and is not only consequence of limited blockage of the xylem vessels. Therefore, the hypothesis of this study is that the tolerance of Ponkan mandarin and susceptibility of sweet orange to CVC can be compared evaluating the differential expression of genes during the infection process, being that the objective of this study.

For that, Ponkan mandarin and sweet orange plants were challenged with *X. fastidiosa*. Infected/non-infected leaves were collected at different times (1, 7, 14, and 21 days). This material was used for extraction of total DNA, which was used for confirming the presence of bacteria by RT-qPCR. After this verification, the RNA was extracted in pools for the construction of suppressive subtractive libraries (SSHs). Six libraries were prepared, but good quality sequences were not obtained. Due to the low efficiency of SSHs, it was decided to proceed with RNA-seq analysis using xylem tissues of mandarin Ponkan, one day after infection with *X. fastidiosa*. In this analysis it was obtained 35,344,265 transcripts for the non-infected library and 37,326,339 for the infected one. These transcripts were mapped in the whole reference genome of *Citrus clementine* by using TopHat software. The contigs generated after this analysis were used to measure the relative expression of the *X. fastidiosa* infected tissue and the control libraries. Analyses with the program Cufflink revealed 1,569 transcripts showing significant repression while 225 were significantly induced (fold  $\geq$  1.0) in the infected mandarin. Differentially expressed transcripts identified in the infected library were used in a search for similar proteins in the NCBI database. In addition, these sequences were automatically annotated and categorized according to functional classes in GO (Gene Ontology).

Among these induced transcripts, we found sequences related to synthesis and organization of the cell wall such as cellulose synthase and HPT, suggesting physical

protection against *X. fastidiosa*. Interestingly, a gene encoding a protein similar to a NBS-LRR disease resistance protein was also expressed indicating perception of molecular signals from the bacteria that trigger a signaling cascade for expression of defense genes.

However, the more interesting response was the induction of genes related to the synthesis of auxin, as well as a receptor for this hormone. These results indicate that the plant may be triggering an immune response by auxin. Another observation supporting this hypothesis is the repression of an *expansin* encoding gene, strengthening the idea that auxin is not really having a role in cell elongation, but may be functioning as a marker for activation of immune response of the plant. Furthermore, it was found a transcription factor, AP2, related to activation of the ethylene pathway, which may be interacting with auxin. Besides, induction of genes related to stress response, such heat shock, peroxidase, P450 and others that are involved in detoxification of cells was also observed.

To validate the results of transcriptome of the tangerine Ponkan, some genes were evaluated by RT-qPCR. The correlation between the results of the two techniques was 0.84 confirming the results obtained in RNA-seq.

Additionally, expression of some genes related to the SA, JA and ET pathways, previously identified in CitEST, was also evaluated in time course for both citrus species. Before beginning the gene expression analysis by RT-qPCR, it were selected the best normalizer using the geNorm algorithm. The genes evaluated were  *$\beta$ -tubulin*, *ETEf2*, *ubiquitin*, *EGIDH* and *cyclophilin* (Homologs in citrus). As a result, the *ubiquitin* and *cyclophilin* genes were those with higher stability in all conditions evaluated. However, we selected the *ETEf2* and *cyclophilin* genes, since they showed no significant changes in expression levels in the analysis of the transcriptome of mandarin Ponkan (xylem).

In the analysis of gene expression in time course, the tangerine Ponkan showed induction of genes related to auxin, JA, and ET pathways in the early times points evaluated. At 21 days after inoculation with bacteria, there was a decrease in expression of these genes. However, some genes of SA pathway were significantly induced. These results demonstrate the dynamic response of defense of Ponkan during the infection process and that seems to be essential to confer the resistance of this species of citrus against attack of *X. fastidiosa*. The results observed in sweet orange were in opposition to those of Ponkan, where it was not possible to observe of activation of auxin and SA

pathways. However, there is induction of genes related to pathways of JA/ET, but much lower than that observed in mandarin. The results of this study confirm the hypothesis that there is differential expression of defense response genes from both species to infection by *X. fastidiosa*. But still is not possible to clarify all the steps of the mechanisms of interaction between the bacteria and these genotypes.

**Keywords:** CVC; Gene expression; Defense genes plant; RNA-seq; Signaling pathways.

## 1. Introdução

A citricultura brasileira é uma das mais importantes agroindústrias respondendo por 85% das exportações de suco concentrado do mundo. Com uma produção anual em torno de 40 milhões de toneladas, o Brasil se destaca como maior produtor de laranja e exportador de suco concentrado congelado (FCOJ) e não concentrado (NFC) dessa fruta (FAO, 2007).

No entanto, esse setor tem enfrentado problemas principalmente de ordem fitossanitária devido ao grande número de pragas e doenças. Dentre essas a clorose variegada dos citros (CVC) é, sem dúvida, uma das mais preocupantes. Essa doença é causada pela bactéria Gram-negativa *Xylella fastidiosa*, de crescimento fastidioso e limitada ao xilema das plantas e ao cibário de cigarrinhas vetores. Atualmente, estima-se que 35,5% dos pomares do Estado de São Paulo apresentam a doença ([www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)) causando um prejuízo da ordem de 150 milhões de dólares por ano à citricultura (Amaro *et al.*, 1998).

A habilidade das plantas em reconhecer um patógeno e responder a ele é o que diferencia a susceptibilidade e resistência de uma interação. Plantas do gênero *Citrus* apresentam respostas variadas em relação à CVC, enquanto laranjas doces (*Citrus sinensis* L. Osb.) são bastante suscetíveis, tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) apresentam níveis elevados de resistência, visto que não é observado o desenvolvimento dos sintomas mesmo sendo possível detectar as bactérias nessas plantas. Contudo, o mecanismo dessa tolerância ainda é desconhecido. Resultados prévios do nosso grupo sugerem que a resistência pode estar envolvida com a ativação de algumas vias de sinalização, pois após 30 dias de inoculação foi observada a expressão de genes envolvidos na via de sinalização do ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e outras (De Souza *et al.*, 2009). No entanto, genes envolvidos na resposta inicial das espécies de citros, suscetível e resistente a bactéria ainda não foram identificados. Portanto, esse estudo focou a identificação de genes candidatos associados à resistência à CVC nos estágios iniciais da infecção de *X. fastidiosa* em plantas suscetíveis e resistentes de citros.

Espera-se que os resultados desse trabalho possibilitem o melhor entendimento dos mecanismos de respostas das duas espécies de citros quanto à infecção de *X. fastidiosa*.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Resistência de plantas à patógenos

Assume-se, em Fitopatologia, que imunidade é regra e suscetibilidade é exceção (Tomiyama, 1963; Romeiro, 1985; Romeiro, 1987; Agrios, 1997). Se assim não fosse, qualquer patógeno seria capaz de infectar qualquer planta e, em curto prazo, em termos evolutivos, os vegetais desapareceriam da face da terra (Romeiro, 1985). Isso não acontece exatamente porque os mecanismos de defesa de plantas contra patógenos existem em multiplicidade e são extremamente eficientes (Kuc, 1985; Goodman *et al.*, 1986; Goto, 1990; Oku, 1994; Romeiro, 1995).

A resistência de um hospedeiro a um microrganismo pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta de atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno em seus tecidos (Goodman *et al.*, 1986). O sistema de defesa vegetal é multicomponente e engloba mecanismos estruturais e bioquímicos, pré- e pós-formados em relação à penetração do patógeno, atuando de maneira dinâmica e coordenada no momento e local apropriados e com magnitude adequada (Issac, 1992; Pascholati & Leite, 1995). Os mecanismos estruturais constituem-se em verdadeiras barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno. Por sua vez, os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (Pascholati *et al.*, 2008).

Os mecanismos pré-formados são barreiras já existentes antes do contato com o patógeno e que visam conter a agressão, sendo que essas barreiras são denominadas de defesas constitutivas e representadas por mecanismos estruturais como: ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, bem como as substâncias bioquímicas pré-formadas como fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (Agrios, 2005; Pascholati & Leite, 1995). Por outro lado, os mecanismos de resistência pós-formados são ativados ou aumentam a concentração de compostos pré-existentes após a infecção com o patógeno. Esses mecanismos envolvem a formação de papila, halo, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, todos considerados mecanismos estruturais.



Já os compostos constituintes dos mecanismos bioquímicos pós-formados são fitoalexinas, espécies reativas de oxigênio e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-PR) (Agrios, 2005; Pascholati & Leite, 1995).

Portanto, o processo pelo qual a resistência da planta é ativada e os eventos subsequentes à indução são contínuos, com acúmulo de compostos que contribuem para a resistência (Kuc, 2001).

## **2.2. Indução de resistência**

As plantas, assim como animais, possuem mecanismos de defesa inatos para se defenderem dos ataques por patógenos. Essa defesa se dá de duas maneiras distintas. A primeira é definida como “*PAMP-triggered immunity*” (PTI), também conhecida como defesa basal ou não-hospedeira. A outra é chamada de “*effector-triggered immunity*” (ETI) ou resistência específica de hospedeira (Cui *et al.*, 2009).

A PTI é ativada por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou a micróbios (MAMPs). Esses efetores são reconhecidos por receptores localizados nas membranas das células hospedeiras que são conhecidos como PRR (receptor de reconhecimento específico de padrões). O mecanismo de defesa PTI ocorre imediatamente após o contato com o patógeno e é considerada a primeira linha de imunidade inata em plantas (Zhang & Zhou, 2010).

O segundo sistema imune inato apresentado pelas plantas é o ETI. Este é baseado na interação altamente específica entre efetores do patógenos e produtos dos genes *R* de acordo com a Teoria Gene a Gene (Boller & Felix, 2009). Os produtos dos genes de avirulência (*Avr*) do patógeno são reconhecidos direta ou indiretamente pelos genes *R*, os quais possuem domínios NB-LRR (*nucleotide binding -leucin rich repeat*). Essa resistência é muito eficaz no bloqueio de doenças em muitas espécies. Entretanto, esse tipo de resistência pode ser rapidamente superada pelo surgimento de novas raças do patógeno (Quirino & Bent, 2003).

Após a ativação do sistema imune inato das plantas, seja por PTI ou ETI, ambos compartilham vias de sinalização semelhantes, incluindo alterações nos níveis de cálcio no citoplasma, produção de espécies reativas de oxigênio e cascata de sinalização via quinases. A amplificação desses sinais se dá por mensageiros secundários como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) resultando na ativação de fatores

de transcrição de genes de defesa e, subsequentemente, na resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica induzida (Grant & Lamb, 2006; Souza *et al.*, 2009).

A expressão de defesa na planta pode ocorrer por meio de duas rotas distintas, divididas em resistência induzida por microrganismos que tem o SA como principal sinalizador, levando a expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade (PR proteins), sendo designada de resistência sistêmica adquirida (SAR, systemic acquired resistance) (Mettraux *et al.*, 1990; Mauch-Mani & Slusarenko, 1996), e a resistência induzida por rizobactérias promotoras de crescimento (PCPR, plant growth promoting rhizobacteria) que é conhecida como resistência sistêmica induzida (ISR, induced systemic resistance), cujos principais sinalizadores são o JA e o ET e são independentes do SA (Bostock, 1999). Contudo, a comunicação cruzada entre as diferentes rotas já foi demonstrada (Pieterse *et al.*, 2005). Portanto, SAR e ISR são entendidas praticamente como sinônimos, designando o fenômeno pelo qual plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados (Sticher *et al.*, 1997). Por esse motivo, alguns autores preferem o uso do termo geral, indução da resistência (Hammerschmidt *et al.*, 2001).

A busca por cultivares resistentes e com boas características agrônomicas sempre foi o objetivo do melhoramento genético, que por muito tempo visou essa seleção mesmo sem o entendimento dos mecanismos envolvidos na resistência (Bonaldo *et al.*, 2005). Porém, plantas podem ser induzidas a desenvolverem aumento de resistência à infecção por patógenos através de tratamento com indutores bióticos e abióticos (Walters *et al.*, 2005). Isso foi observado por vários pesquisadores em alguns patossistemas, com a ocorrência de indução de resistência. Esses mecanismos podem ser ativados não apenas no sítio de indução, conhecido como resistência local, como também em outros locais dele distante. Esse processo é conhecido como resistência sistêmica, onde os mecanismos de defesa são ativados de forma generalizada manifestando-se a distância do sítio de indução (Sticher *et al.*, 1997). Os agentes indutores podem ter origem biótica ou abiótica e são capazes de induzir qualquer reposta de resistência nas plantas e são chamados de elicitores (Smith, 1996; Bonaldo *et al.*, 2005). Esses agentes podem ser de origem orgânica, como por exemplo, extratos de células de microrganismos (Hoffland *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1995a; Liu *et al.*, 1995b; Liu *et al.*, 1995c), ou inorgânicos, como cloreto férrico, fosfato de potássio dibásico (Bécot *et al.*, 2000), ácido salicílico e seus análogos funcionais, o ácido 2,6-

dicloroisonicotínico (INA) (Besser *et al*, 2000) e o acibenzolar-S-metil (ASM) (Kuhn, 2007; Besser *et al*, 2000), como também ácido jasmônico (Cipollin, 2002).

Adicionalmente, cultivares suscetíveis ou com baixo nível de resistência também pode apresentar respostas de defesa através da indução de resistência, desenvolvendo mecanismos de defesas típicos de uma reação incompatível (quando não ocorre a doença). Portanto, a rota de transdução de sinal da resistência induzida tem a função de potencializar os mecanismos existentes de defesa, confinamento do fitopatógeno no local da infecção por meio da morte programada de células, deposição de calose, formação de espécies reativas de oxigênio, síntese de proteínas-PR como quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase, entre outras (Gilchrist, 1998).

### **2.3. Mecanismos de sinalização envolvidos nas respostas de interação planta – patógeno**

O processo de sinalização das plantas pode ser dividido em três etapas básicas: percepção do sinal, ou reconhecimento, realizada por receptores celulares específicos ou inespecíficos que reconhecem um determinado sinal; a transdução de sinal, que consiste na transmissão desse sinal para o sítio de ação dentro da célula, podendo ser feita de forma direta ou indireta (via mensageiros secundários, alterações na fosforilação de proteínas e através de proteínas-G); e a tradução do sinal, que é a conversão dos sinais em repostas celulares específicas como, por exemplo, a ativação de genes que induzem a síntese de proteínas-PR e de certas enzimas regulatórias do processo de produção de fitoalexinas (Campos *et al.*, 2010).

#### 2.3.1. Percepção do sinal

A percepção do sinal consiste no reconhecimento de um eliciador por receptores celulares levando à indução de respostas de defesa (Resende *et al*; 2007).

Na percepção dos PAMP's pelos receptores PRRs, as plantas ativam diferentes respostas de defesa, incluindo alterações nos níveis de  $Ca^{2+}$  no citoplasma, ativação da cascata de MAP quinases (MAPK's, proteínas quinases ativadas por mitógenos), indução de genes relacionados à defesa, produção de fitoalexinas, produção de espécies ativas de oxigênio (ROX) e óxido nítrico (NO), deposição de calose para reforçar a

parede celular e fechamento dos estômatos para prevenir a entrada de bactérias fitopatogênicas (He *et al.*, 2007; Resende *et al.*; 2007).

Entre os exemplos de PAMPs/MAMPs estão polissacarídeos, exoenzimas e adesinas, provenientes de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanas de bactérias Gram-positivas, flagelina e fator de alongação TU (EF-Tu) de bactérias, bem como glucanas, quitinas e proteínas derivadas da parede celular de fungos (Souza *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2010). Embora um número crescente de componentes do tipo PAMP's tenha sido identificado, os receptores em potencial para a maioria deles ainda são desconhecidos. Entre os receptores identificados estão o receptor de flagelina (FLS2), fator de alongação (EF-Tu), o receptor de quitina (CERK1) em *Arabidopsis*; uma proteína de ligação à  $\beta$ -glucana (GnGBP) e à quitina (CERK1), o receptor de xilanase (LeEIX), e um receptor de quinase (XA21) em arroz, o qual reconhece Xoo e AX21 (Kunze, 2005; Zhang & Zhou, 2010).

Por outro lado, para superar a resistência de não-hospedeira, patógenos evoluíram para o sistema imune ETI, o qual está relacionado à interação específica das proteínas R com os efetores Avr dos patógenos (Boller & Felix, 2009). A maioria dos genes R clonados codifica para uma proteína que apresenta um domínio central de ligação a nucleotídeos (NB), outro com regiões repetidas ricas em leucina (LRR), o qual medeia o reconhecimento de diversos efetores de todas as classes de patógenos de plantas, e um terceiro domínio variável no N-terminal que pode ser TIR (Toll-interleukin) ou CC (coiled-coil) (DeYoung & Innes, 2008).

O reconhecimento dos efetores pelos genes que codificam para NB-LRRs pode ocorrer de maneira direta, com a interação física entre o receptor e o efector, ou de forma indireta mediada por proteínas adicionais dos hospedeiros, segundo a “Hipótese Guarda”. Esta sugere que as proteínas R monitoram essas proteínas adicionais e ativam a defesa quando essas são perturbadas (Jones, 2001). Portanto, NB-LRR pode reconhecer o patógeno indiretamente através do domínio N-terminal (CC ou TIR) usando um fator intermediário do hospedeiro (Host factor). Atualmente, existem duas variações desse modelo. A primeira é que o receptor imune R está associado constitutivamente ao *Host factor*, ou esse fator liga-se primeiro ao efector do patógeno e então, posteriormente esse complexo é reconhecido pelo receptor imune (Caplan *et al.*, 2008; Elmore *et al.*, 2011).

Além das classes TIR e CC das proteínas R, existem outras classes que se destacam. Uma delas é a LRR Quinase que codifica para proteínas com receptores LRR

extracelulares e domínios quinases serina/treonina citoplasmáticos (Afzal *et al.*, 2008). A outra é a eLRR, que codifica proteínas extracelulares, as quais possuem domínios LRR extracelulares e domínios transmembrânicos. Três subclasses de eLRR's são classificadas de acordo com seus domínios (Fritz-Laylin *et al.*, 2005; Resende *et al.*, 2007). Essas subclasses incluem RLP's (proteínas tipo receptor; LRR extracelular e domínio trans-membrana [TM]), RLK (LRR extracelular, domínio TM e quinase citoplasmática) e PGIP (proteína inibidora de poligalacturonase; LRR parede celular). As melhores RLP's caracterizadas são representadas pelos genes *Cf* de tomate, que conferem resistência a *Cladosporium fulvum* (Jones *et al.* 1994; Resende *et al.*, 2007).

Embora as NB-LRR estão no citoplasma, elas também são móveis e podem se translocarem para o núcleo, cloroplasto ou mitocôndria. Como exemplo, podemos citar a MLA de cevada e RPS4 de Arabidopsis. Em alguns casos, tem sido proposto que essas proteínas NB-LRR estão associadas à defesa basal por associação com fatores de transcrição WRKY no núcleo (Shen *et al.*, 2007; Tör *et al.*, 2009).

### 2.3.2. Transdução de sinal

A transdução de sinal consiste na transmissão, de forma direta ou indireta, deste para o sítio de ação dentro da célula. O processo inicia-se após o reconhecimento eliciador-receptor e envolve alterações na fosforilação de proteínas e mensageiros secundários (Resende *et al.*, 2007).

A transdução de sinal para respostas de defesa em plantas, após o reconhecimento do(s) eliciador(es) pelo(s) receptor(es), pode assim ser resumida como: abertura de canais de íons → acidificação do citoplasma → ativação de quinases no citoplasma → ativação do complexo NADPH-oxidase → produção de espécies ativas de oxigênio → ativação de outros mensageiros secundários (SA, JA e ET) → ativação de fatores de transcrição → transcrição de genes de defesa (proteínas-PR, enzimas de fitoalexinas, lignificação de tecidos, calose e outros reforços da parede celular) → resistência local (reação de hipersensibilidade) e, subsequentemente, 'imunidade' sistêmica (SAR ou ISR) (Campos *et al.*, 2010).

Como citado acima, uma das primeiras respostas das células vegetais após a interação com o eliciador é a rápida alteração do potencial transmembrânico e a alcalinização extracelular, devido ao influxo de H<sup>+</sup> e Ca<sup>2+</sup> e o efluxo de K<sup>+</sup> (Nürberger *et al.*, 1994). Na membrana plasmática (MP), os canais de íons são rapidamente

ativados por patógenos ou tratamentos com eliciadores. A alcalinização extracelular, influxo de cálcio e efluxo de  $K^+$  e  $Cl^-$ , levam à despolarização da MP (Blume *et al.*, 2000; Resende *et al.*, 2007).

Canais de  $K^+$  são cruciais para a homeostase celular, regulação osmótica e estabilidade das células. O funcionamento correto depende tanto do controle da atividade destes na MP, como da regulação do número destes (Mikosch *et al.*, 2006). Se ocorrer efluxo de  $K^+$  durante o ataque do patógeno, provavelmente, a célula ficará desestabilizada. Essa desestabilização será percebida e mecanismos de defesa serão disparados até que a atividade e a concentração iônica sejam normalizadas, levando a uma interação incompatível. No caso de interações compatíveis, essa alteração no fluxo de íons torna-se irreversível e o desfecho do processo culmina com a perda de eletrólitos e morte celular generalizada (Resende *et al.*, 2007).

A amplificação do sinal de defesa ocorre através dos mensageiros secundários. Entre esses, os mais comuns são as proteínas quinases, proteínas-G,  $Ca^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ -calmodulina, cAMP (adenosina monofosfato cíclica),  $IP_3$  (inositol 1,4,5-trifosfato), ácido diacilglicerol (DAG), além do NO, envolvidos na explosão oxidativa (Resende *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2010).

Outros exemplos de moléculas sinalizadoras são as ROS, peróxidos de lipídeos, ácido benzóico (BA), ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA), etileno e auxina (IAA). Estes, por sua vez, induzem outros genes relacionados à defesa e modificam proteínas de defesa e enzimas. A comunicação entre as várias rotas induzidas parece coordenar as respostas. Em todos os processos de preparo das respostas de defesa, os mensageiros secundários têm um papel fundamental (Campos *et al.*, 2010).

### 2.3.2.1. Mensageiros secundários

#### 2.3.2.1.1. Proteína-G

As proteínas-G são um grupo de proteínas capazes de se unirem ao nucleotídeo guanina formando assim, um complexo com o receptor e aumentando a afinidade por GTP. Na interação de um determinado receptor com a proteína-G (composta por subunidades  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -), são geradas mudanças na conformação da referida proteína, pela troca de GDP por GTP, o que pode aumentar ou inibir a atividade 'downstream' de moléculas efetoras como adenilato ciclase, fosfatidilinositol, fosfatidilinositídeos-

quinase e transportadores de íons, ativando ou inibindo a produção de outros mensageiros secundários (Leite *et al.*, 1997; Resende *et al.*, 2007).

Na presença do eliciador, a proteína-G é ativada e induz a atividade da adenilato ciclase, enzima responsável pela síntese de cAMP. A alteração na concentração de cAMP no interior da célula influencia a atividade de certas proteínas responsáveis pela fosforilação de proteínas-alvo. Estas podem ativar processos metabólicos ou a transcrição de genes específicos, levando, por exemplo, à indução de síntese de fitoalexinas e à reação de hipersensibilidade em soja (Leite *et al.*, 1997; Resende *et al.*, 2007).

#### 2.3.2.1.2. Inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e ácido diacilglicerol (DAG)

Fosfolipídios presentes na MP estão envolvidos na sinalização de plantas e produzem respostas rápidas ao estresse (Szczegielniak *et al.*, 2005). Como consequência, há geralmente uma degradação enzimática destes fosfolipídios, separando-se a porção polar (a exemplo do IP<sub>3</sub>) da calda apolar (DAG), gerando assim potentes moléculas sinalizadoras (Resende *et al.*, 2007).

O IP<sub>3</sub> e o DAG são produzidos simultaneamente a partir da hidrólise de fosfatidil-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), pela ação da enzima fosfolipase C (PLC), a qual é ativada ao receber sinais provenientes do ataque do patógeno (Leite *et al.*, 1997; Burnette *et al.*, 2003). A atividade IP<sub>3</sub> e DAG é regulada por sinalização transmembrana envolvendo proteínas-G e pode disparar uma cascata de eventos de forma conjunta ou separada (Resende *et al.*, 2007). O IP<sub>3</sub> induz o influxo do Ca<sup>2+</sup> armazenado no retículo endoplasmático, por meio de canais iônicos, para o citoplasma aumentando a [Ca<sup>2+</sup>]. DAG e Ca<sup>2+</sup> induzem a atividade de uma proteína quinase C (QPC), a qual fosforila resíduos serina/treonina de si mesma e de certas proteínas regulatórias, ou é convertido em ácido fosfatídico (PA), outro importante mensageiro secundário que pode ativar várias respostas intracelulares (Trewavas, 2000; Resende *et al.*, 2007).

A ativação do metabolismo de PI parece ser um processo indispensável para a iniciação da resposta de defesa em plantas.

#### 2.3.2.1.3. Cálcio (Ca<sup>2+</sup>)

O  $\text{Ca}^{2+}$  é estabelecido como um mensageiro secundário muito importante, sendo universal em células eucarióticas, e tem função fundamental nas respostas a vários estímulos, inclusive como o principal mensageiro de interações planta/patógeno (Popescu *et al.*, 2007). Já foi demonstrada a sua participação na deposição de calose, na regulação da síntese de fitoalexinas e em outras respostas de defesa, estabilidade de membranas e células, integridade celular e ativação de várias enzimas. A redução nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  em tecidos de plantas pode gerar perda total na quantidade de produtos, visto que esses tecidos podem apresentar maior suscetibilidade a patógenos. Processos de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  interrompidos podem levar à perda da integridade da membrana e à morte celular (Szczegieliak *et al.*, 2005; Ohori-Ihara *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2007).

É sabido que em plantas, e não em animais, o cálcio se liga ao domínio EF da enzima NADPH-oxidase, enzima essa que inicia a explosão oxidativa. Ele funciona também como co-fator para a enzima  $\beta$ -1,3-glucana sintase (calose sintase), enzima chave de defesa das plantas (Hammond-Kosack & Jones, 2000). Segundo Blume *et al.* (2000), efetores *downstream* codificam sinais complexos que provavelmente constituem um mecanismo pelo qual  $\text{Ca}^{2+}$ , mensageiro secundário multifuncional, mantém a especificidade na cascata de sinalização.

Outro sinal molecular codificado pelo  $\text{Ca}^{2+}$  são as proteínas quinases dependentes de cálcio (CDPK's), que têm papel importante na sinalização durante situações de estresse, inclusive na sinalização durante estádios do reconhecimento de patógenos (Popescu *et al.*, 2007).

Trabalhos que esclareçam melhor os mecanismos pelos quais o  $\text{Ca}^{2+}$  atua em suas diversas funções nas plantas, e especialmente como mensageiro secundário nas respostas de defesa a patógenos, são importantes para que novas tecnologias de controle de doenças sejam desenvolvidas, já que este também participa em várias rotas de importância no desenvolvimento, estrutura de defesa de plantas, tais como etileno, enrijecimento de parede, ácido jasmônico e espécies ativas de oxigênio (Resende *et al.*, 2007).

#### 2.3.2.1.4. Espécies ativas de oxigênio (ROS)

No início da interação com determinado patógeno, as plantas podem produzir uma série de respostas de defesa, incluindo geração de espécies ativas de oxigênio



(ROS), tais como superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a hidroxila livre ( $OH^\cdot$ ) (Lamb & Dixon, 1997; Mur *et al.*, 2008).

As ROS, também conhecidas como intermediários reativos de oxigênio ('reactive oxygen intermediates, ROI') ou espécies reativas de oxigênio ('reactive oxygen species', ROS) são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas (Mehdy *et al.*, 1996), produzidas nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas, como produtos secundários da fotossíntese e respiração (Apel & Hirt, 2004). No entanto, diversos fatores bióticos ou abióticos, tais como excesso de luz (Mullineax & Karpinsk, 2002), excesso de cádmio (Olmos *et al.*, 2003), ferimentos (Olson & Varner, 1993), luz UV, extremos de temperatura, poluentes do ar e ataque de fitopatógenos (Allan & Fluhr, 1997; Torres, 2010) podem aumentar sua produção (Resende *et al.*, 2007).

No começo do processo infeccioso, as ROS podem se acumular rapidamente em um fenômeno conhecido como explosão oxidativa (Lamb *et al.*, 1989). Essas moléculas podem agir causando danos diretos aos patógenos, através de seu efeito tóxico ou inibindo seu desenvolvimento, ou agindo como moléculas sinalizadoras que ativam múltiplas respostas de defesa (Gadjev *et al.* 2006). Sabe-se também que o acúmulo de ROS's está associado ao fortalecimento da parede celular por favorecer a formação de ligações cruzadas entre proteínas estruturais (glicoproteínas ricas em prolina ou hidroxiprolina) à matriz de polissacarídeos (Hammond-Kosack & Jones, 2000); ativação de resposta de hipersensibilidade (HR) associada à morte celular (Gechev & Hille, 2005); aumento na taxa de formação de polímeros de lignina, uma vez que o peróxido de hidrogênio participa da última reação da rota de síntese desta macromolécula (o substrato fenólico é oxidado a lignina, ao mesmo tempo em que o peróxido de hidrogênio é reduzido à água) (Hammond-Kosack & Jones, 2000); além de, o peróxido de hidrogênio também ser necessário para a biossíntese de ácido salicílico, potente sinalizador para a ocorrência de SAR, uma vez que este aumenta a atividade da enzima ácido benzóico-2-hidrolase (BA-2H), responsável pela conversão do ácido benzóico em AS (Hammond-Kosack & Jones, 2000; Resende *et al.*, 2007).

Uma das respostas mais rápidas de defesa das plantas contra o ataque de patógenos é a explosão oxidativa, a qual consiste na produção de ROS, principalmente de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  no local da tentativa de invasão (Apel & Hirt, 2004; Amrit *et al.*, 2010). O primeiro passo da geração de ROS a partir do oxigênio molecular ( $O_2$ ) é a formação do radical ou ânion superóxido em um processo mediado, geralmente, pelas enzimas NADPH-oxidase ligada à MP ou peroxidase (POX) ligada à parede celular (Mehdy *et*

*al.*, 1996; Olmos *et al.*, 2003). O radical superóxido é altamente tóxico e pode rapidamente regenerar o O<sub>2</sub> ou ser convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Apel & Hirt, 2004).

É importante ressaltar que as ROS quando acumuladas tornam-se tóxicas às células e por isso estas dispõem de mecanismos para detoxificá-las. Conhecidos como ‘scavengers’, os mecanismos de limpeza de ROS incluem moléculas antioxidantes e enzimas, tais como SOD, ascorbato peroxidase (APX), glutatinoxidase (GPX) e catalase (CAT), entre outras, que controlam a concentração desses compostos reativos e o estado redox das células (Apel & Hirt, 2004).

Durante as repostas de defesa ao ataque de um patógeno, a planta produz ROS e simultaneamente diminui sua capacidade de limpá-las, ocorrendo seu acúmulo e ativação da morte celular programada (PCD). Dessa forma, a supressão dos mecanismos detoxificadores é um fator crucial para o início da PCD (Apel & Hirt, 2004). Uma vez que em altas concentrações o peróxido de hidrogênio está implicado na indução de PCD e em pequenas quantidades pode funcionar como molécula sinalizadora, a habilidade do sistema de limpeza das células em detoxificar o excesso de ROS é um processo crucial para o início da sinalização através do peróxido de hidrogênio. O sinal do peróxido de hidrogênio pode ser transmitido através da cascata de MAPK’s ou através de alterações no fluxo de íons de cálcio e no estado redox da célula, já que esse estado é profundamente alterado durante a explosão oxidativa (Gechev & Hille, 2005).

#### 2.3.2.1.5. Óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso, simples, pequeno e extremamente reativo, que está envolvido em muitos processos fisiológicos e rotas de sinalização, incluindo a germinação, o crescimento de folhas e de raízes, atraso na senescência das folhas e maturação dos frutos (Wang & Higgins, 2006). O NO também participa das respostas de resistência de plantas a doenças. Evidências atuais indicam que o NO interage com muitas moléculas sinalizadoras envolvidas em respostas adaptativas das plantas a estresses bióticos e abióticos, incluindo ABA e ROS (Romero-Puertas *et al.*, 2004; Neill *et al.*, 2003). Além disso, NO afeta diretamente a atividade de algumas enzimas envolvidas na biossíntese da lignina (Garbalgón *et al.*, 2005), age como fator de regulação da PCD em associação com a lignificação durante a formação dos vasos do

xilema (Neill, 2005) e induz o acúmulo de SA (Delledonne, 2005). O NO também promove a capacidade antioxidante das plantas aos danos por ROS (Bai *et al.*, 2011).

Em plantas, assim como ocorre em mamíferos, o NO é responsável pela ativação da enzima guanilato ciclase, responsável pela geração do cGMP, um conhecido mensageiro secundário de sinalização de respostas de defesas (Neill *et al.*, 2003). O cGMP, por sua vez, pode ativar os canais de cálcio, direta ou indiretamente, pela formação da ribose-ADP cíclica (cADPR), um regulador de canal de cálcio, ou pela estimulação da cascata de fosforilação de proteínas (Neill *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos indicam que ROS sozinhos não podem ser suficientes para induzir a morte da célula vegetal (Dorey *et al.*, 1999). Entretanto, evidências indicam que eles podem agir paralelamente ou em sinergia com NO para que ocorra a HR (Delledonne *et al.*, 2001; De Pinto *et al.*, 2002). Esse fenômeno foi demonstrado em suspensão de células de soja (Delledonne *et al.*, 2001) e em *Arabidopsis* (Murgia *et al.*, 2004).

#### 2.3.2.1.6. Ácido salicílico (SA)

O SA é derivado do ácido benzóico ou ácido coumárico na rota dos fenilpropanóides. A principal enzima que catalisa a síntese do SA é a fenilalanina amônia liase (PAL) (Wildermuth, 2006). Esse hormônio exerce vários papéis nas respostas de defesa da planta, geralmente relacionado à defesa contra patógenos biotróficos (Hammond-Kosack & Parker, 2003).

O acúmulo de SA nas plantas no local de infecção dispara um mecanismo denominado SAR (Durrant & Dong 2004). Este mecanismo de defesa é induzível e confere resistência de longa duração contra um amplo espectro de patógenos e atua nas plantas em locais distantes do sítio de infecção. O SA é uma molécula essencial e suficiente para a ativação de SAR (Zhang *et al.*, 2010). A demonstração que o SA é necessário para induzir a SAR surgiu com o uso de plantas transgênicas expressando o gene *nahG* de *Pseudomonas putida*. Esse gene codifica a enzima salicilato hidroxilase, responsável pela conversão de SA em catecol (não indutor de SAR) e as plantas transformadas pela sua inserção foram incapazes de acumular SA, comprometendo a SAR (Gaffney *et al.*, 1993).

A transdução de sinal do SA requer NPR1 (não expressor de genes PR), uma proteína conservada regulatória de SAR também conhecida como NIM1 (não imune) (Dong, 2004).

O acúmulo de SA induz uma mudança no potencial redox celular disparando a redução de NPR1 citológico e oligômeros ligados por pontes dissulfetos para ativar monômeros que se translocam para o núcleo e interagem com fatores de transcrição TGA. Essas interações estimulam a ligação desses fatores aos elementos responsivos de AS em promotores de genes PR, e a reprogramação da transcrição subsequente contribui para o estabelecimento da SAR (Pieterse & Van Loon, 2004). O fator de transcrição WRKY70 também é requerido para expressão de PR-1 em resposta a infecção mediada por SA. A expressão de WRKY70 é dependente de NPR1 e parece estar associada à característica antagônica da relação entre SA e ET/JA. Em *Arabidopsis thaliana*, a indução de WRKY70 resultou na expressão constitutiva de genes PR responsivos a SA (Li *et al.*, 2006).

Um fato importante que deve ser relatado é que pesquisas sobre sinalização de defesa mostraram que o SA está envolvido na defesa de plantas, sozinho ou em conjunto com outros sinalizadores endógenos como MeJA, ET e ácido abscísico (ABA) (Pieterse *et al.*, 2005).

#### 2.3.2.1.7. Ácido jasmônico (JA) e etileno (ET)

O JA é um fitohormônio derivado do ácido linolênico. Sua biossíntese inicia-se com a quebra de ácidos graxos não saturados das membranas dos cloroplastos, pela ação das lipases, formando o ácido linolênico (Delker *et al.*, 2006). Além das lipases, outras enzimas importantes, tais como LOX, aleno óxido sintase (AOS) e aleno óxido ciclase (AOC) estão envolvidas no processo de síntese desse hormônio (Crozier *et al.*, 2000). O JA pode mediar informações a longas distâncias na planta através de sinais sistêmicos, ou até mesmo entre plantas, por meio de sinais voláteis (MeJA – metil jasmonato), podendo ser considerado como pivô na evolucionária e conservada rede de sinalização, pois exerce papel importante na ativação de ISR eliciada por rizobactérias não-patogênicas. A ocorrência de uma sobreposição da rota de JA indica que os jasmonatos codificam múltiplos sinais por estresses bióticos e abióticos de maneira interativa (Truman *et al.*, 2007).

O JA desempenha um papel fundamental na resposta de plantas a herbivoria (Wasternack, 2007). A importância desse hormônio nas respostas de defesa pode ser verificada pela análise de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes insensíveis a *jar1*, o qual está relacionado à síntese de JA, as quais se mostraram altamente suscetíveis aos fitopatógenos *Pythium irregulare* e *Pythium mastophorum* (Staswick *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998). Plantas mutantes de *A. thaliana* deficientes na síntese de JA também foram incapazes de expressar *LOX2*, uma enzima envolvida na via desse hormônio, e *PDF1-2*, uma defensina induzida por JA e ET (Vijayan *et al.*, 1998).

O ET, é outro fitohormônio que participa de respostas de defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos (Crozier *et al.*, 2000), entre elas, a infecção por fitopatógenos e ferimentos mecânicos (Dong, 1998; Kachroo *et al.*, 2000).

Para a biossíntese do etileno, a metionina (Met) é convertida em *S*-adenosilmetionina (AdoMet) pela enzima *S*-AdoMet sintase (ADS). A ACC sintase converte o AdoMet em ácido 1 aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). O ACC é degradado pela ACC oxidase (ACO) resultando na formação do etileno (Lin *et al.*, 2009).

Após a biossíntese do ET, devido a algum estímulo, ele se liga ao receptor ETR1 (receptor de etileno), o qual é uma proteína integral de membrana. Essa ligação resulta na inativação de um regulador negativo chamado CTR1 (constitutive triple response). A inativação desse regulador permite que a proteína transmembranar EIN2 torne-se ativa. Essa proteína pode agir como um poro ou canal. Uma substância, possivelmente um íon, pode difundir-se através do canal (EIN2) e ativar um fator de transcrição (EIN3). Este é um fator de transcrição que age na regulação da expressão de genes nucleares que vão especificar uma determinada resposta fisiológica (Taiz & Zeiger, 1998). A modulação da atividade de EIN3 por ET não ocorre inicialmente pela regulação transcricional direta, mas sim pelo controle proteolítico do complexo SCF (SKP1/Cullin/F-box protein) E3 ubiquitina ligase (Chao *et al.*, 1997; Guo & Ecker, 2003). Proteínas F-box EBF1 e EBF2 interagem fisicamente com EIN3 na ausência de ET e desestabilizam a estrutura protéica. Na presença de ET a degradação de EIN3 é suprimida, permitindo que os níveis da proteína EIN3 aumentem, dando continuidade à sinalização por ET (Potuschak *et al.*, 2003).

Em relação às respostas de defesa, o ET atua na regulação de processos como a indução de oclusões do xilema e reforço da parede celular, na produção de fitoalexinas e ativa a transcrição de PRs como, a  $\beta$ -1,3-glucanase (PR-2), a quitinase básica (PR-3), a

proteína ácida tipo-heveína (PR-4) e algumas defensinas (PDFs; PR-12) (Adie *et al.*, 2007).

A comunicação entre as rotas de sinalização do ET e do JA determina a ativação de uma série de respostas de defesa contra patógenos e insetos. As rotas desses dois hormônios convergem na ativação do fator de transcrição ERF1 ('ethylene response factor 1'), que regula a expressão de genes de resposta a patógenos. A expressão de ERF1 pode ser ativada rapidamente pelo ET ou JA e pode ser ativada sinergisticamente por ambos os fitohormônios. O ERF1 age abaixo da inserção entre as rotas do ET e JA, sugerindo que esse fator de transcrição é um elemento chave na integração de ambos os sinais para a regulação dos genes de defesa (Lorenzo *et al.*, 2003). Além disso, a sinalização dependente de JA segue através do aumento da síntese de JA em resposta ao ataque de patógenos e conseqüentemente aumenta a expressão de genes efetores de defesa, como *PDF1.2*. No caso de *PDF1.2*, o aumento da expressão requer ambos ET/JA. Em *A. thaliana*, a indução de *PDF1.2* após inoculação com *Alternaria brassicicola* foi inibida nos mutantes *coi1* e *ein2*, indicando o papel dos genes *COI1* e *EIN2* na sinalização de resposta de defesa mediada por ET/JA (Penninckx *et al.* 1998; Thomma *et al.* 2001).

Adicionalmente, os insetos mastigadores ferem os tecidos das plantas enquanto se alimentam, induzindo o rápido acúmulo de inibidores de proteinases (IP's) e outras proteínas de resposta sistêmica ao ferimento (SWRP's) na plantas. Dessa forma, eles ativam uma resposta protetora diferente da induzida por fungos, bactérias e vírus. Como exceção pode ser citado os nematóides, que induzem uma mistura de SAR e inibidor de proteinase sistêmico/resposta ao ferimento (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

Além disso, altas concentrações de oligogalacturonídeos liberados da parede celular ferida induzem os genes que codificam para *IP's* e *SWRP's* apenas no local, já que estas não se movimentam sistematicamente. No entanto, a sistemina, um polipeptídeo de 18 aminoácidos, liberada das células feridas é transportada pelo floema para partes não danificadas, onde ativa a cascata de sinalização que produz JA. Este, por sua vez, induz a ativação da transcrição de *IP's* e outros genes *SWRP*. Contudo, a ativação dos genes *IP's* também requer outra molécula sinalizadora: etileno. Aumentos simultâneos na concentração de JA e ET são necessários para a indução de *SWRP's*. Quando a síntese de ET é bloqueada, o ferimento, a sistemina ou o JA sozinho pode induzir a expressão de *IP's*. Portanto, o ET deve atuar abaixo do JA na rota de sinalização (Hammond-Kosack & Jones, 2000).

### 2.3.2.1.8. Auxina

Hormônio vegetal é um composto orgânico de ocorrência natural, produzido na planta, o qual em baixas concentrações, promove, inibe ou modifica processos morfológicos e fisiológicos de modo sistêmico (Montans, 2007).

A auxina foi o primeiro hormônio a ser descoberto em plantas. Tem como principal efeito fisiológico a indução do alongamento celular pela ativação da bomba de prótons (ATPase), promovendo dessa forma, a acidificação da parede celular, possibilitando a ação das enzimas hidrolíticas sintetizadas pela ação das giberelinas, promovendo o alongamento do caule, dominância apical, formação de raiz, desenvolvimento de frutos e o crescimento orientado ou tropismo. O ácido indolacético (IAA) é a única auxina natural. O IAA é sintetizado a partir do triptofano, tendo a via mais importante como principais compostos intermediários o ácido 3-indolilpirúvico e o 3-indolilacetaldeído (Taiz & Zeiger, 2009).

Contudo, muitos estudos têm demonstrado que a auxina também pode exercer efeitos rápidos e específicos sobre os genes a nível molecular. Os genes que têm sido extensivamente estudados são aqueles induzidos especificamente por auxina e na ausência de síntese proteica, conhecidos como genes de resposta primária à auxina, e se dividem em três grandes classes: Aux/IAAs, SAURs e GH3s (Abel & Theologis, 1996).

Os SAURs fazem parte de um grupo de pequenos RNAs induzidos por auxina. Eles foram identificados pela primeira vez em soja tratadas com auxina (McClure & Guilfoyle, 1987). Contudo, a função dos genes *SAURs* permanece desconhecida. Foram feitas muitas tentativas utilizando mutantes em diferentes *SAURs* para identificar a função desses genes. O insucesso na descoberta da função desses genes pode ser devido a várias razões, tais como a redundância funcional e a compensação funcional através de outros mecanismos (Jain *et al.*, 2006).

Em um trabalho realizado por Kant *et al.* (2006), o gene *SAUR39* de arroz não só é induzido por auxina, como também responde a estímulos ambientais como, anoxia, salinidade e aplicação de citocinina. A exposição prolongada ou recorrente de plantas de arroz a essas condições poderiam induzir o gene *SAUR39* por um longo período e possivelmente levando a uma repressão similar na síntese e transporte de auxina e menor crescimento e produção observados em plantas super expressando esse gene. No entanto, a compreensão completa dos mecanismos moleculares deste e de outros *SAURs*

poderá esclarecer o envolvimento desses genes na sinalização de auxina e seu envolvimento no *feedback* da regulação do nível de auxina na planta.

Para a busca da função dos genes *SAURs*, os autores Hagen e Guilfoyle (2002), sugerem para trabalhos futuros: (1) Compreensão dos papéis dos *SAURs* via interação com genes *calmodulina*, uma vez que, vários genes *Ca<sup>+</sup>-binding/ calmodulina* foram altamente expressos em plantas de arroz superexpressando *SAUR39* (Kant *et al.*, 2006), além de, algumas proteínas *SAURs* terem sido mostradas ligadas à proteínas *Ca<sup>+</sup>-binding/ calmodulina* (Yang & Poovaiah, 2000); (2) Estudos com a interação de *SAUR* com outras proteínas induzidas em resposta a auxina e fatores de transcrição que respondam a auxina; (3) Identificação de outros genes *SAURs* através de análises de transcriptoma em diferentes condições de crescimento e caracterização do ganho e perda funcional desses genes nas plantas para identificar suas funções únicas e não funções em “overlapping” em vários tecidos ou na planta toda.

O gene *GH3* codifica uma proteína de 70 kDa com função desconhecida, e faz parte de uma pequena família multigênica em soja (Hagen *et al.*, 1991).

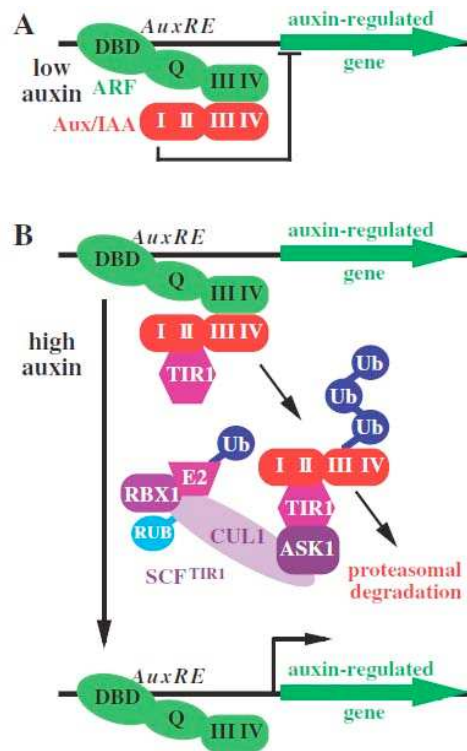
Recentemente, proteínas *GH3* têm sido bioquimicamente caracterizadas. *JAR1* de *Arabidopsis* foi encontrada ativando *JA* através da conjugação com isoleucina. Vários outros genes *CH3* codificam enzimas que se conjugam a aminoácidos de *IAA* (Staswick, & Tiryaki, 2004). Os autores Staswick, *et al* (2002) sugerem que a enzima *CH3.5* é alvo para ambos *IAA* e *SA*, inferindo que esta enzima possui um papel nas interações entre esses hormônios. A rápida indução de genes *CH3* por auxina ajuda a regular a homeostase desse hormônio através da conjugação da auxina em excesso com aminoácidos. Foi demonstrado que as respostas de adaptação de *Arabidopsis* a estresses bióticos ou abióticos, em parte, são mediadas pela homeostase de auxina através da regulação negativa pelo grupo de enzimas *GH3*. A superprodução de um *IAA* conjugado com *GH3* causa a redução do crescimento, o qual está intimamente relacionado ao aumento da resistência a estresse (Park *et al.*, 2007).

Os *Aux/IAA*, outra classe de genes relacionados à resposta primária a auxina, codificam proteínas que possuem tamanho variável entre 20 a 35 kDa e estão localizadas no núcleo. Essas proteínas possuem quatro domínios altamente conservados (Domínios I, II, III e VI) separados por regiões variáveis (Abel *et al.*, 1995; Reed, 2001). O domínio I é responsável por reprimir a atividade das proteínas (Tiwari & Guilfoyle, 2004), enquanto que o domínio II confere instabilidade para as proteínas *Aux/IAA* que podem ser alvo de ubiquitinação (Ouellet *et al.*, 2001). A auxina promove a associação



entre Aux/IAA e uma proteína de auxina F-box, ativando a E3 ligase que leva a degradação de Aux/IAA permitindo assim a liberação dos fatores de resposta à auxina (ARFs) do complexo com Aux/IAA (Guilfoyle, 1998). Os Domínios III e VI servem para homodimerização e heterodimerização com outros membros da família de genes Aux/IAA bem como para heterodimerização com ARFs (Ouellet *et al.*, 2001). Estes se ligam aos elementos de resposta a auxina (AuxREs) na região promotora de genes que respondem a auxina, incluindo Aux/IAAs, através de seu domínio de ligação (Ulmasov *et al.*, 1997).

Os autores Woodward & Bartel (2005), propuseram um modelo para a sinalização de genes de repostas primária a auxina (Figura 1).



**Figura 1.** A  $SCF^{TIR1}$  ubiquitina liase degrada Aux/IAA ativando ARFs. **(A)** Uma proteína ARF ativa (verde) se liga a AuxRE através de um domínio N-terminal (DBD). Em baixas concentrações de auxina, um repressor de Aux/IAA (vermelho) se liga ao ARF via heterodimerização entre seus domínios III e VI. **(B)** A auxina promove a associação do domínio II de Aux/IAA com a proteína TIR1, trazendo a proteína Aux/IAA para o complexo  $SCF^{TIR1}$  (roxo) para ubiquitinação (Ub) e posterior destruição pelo proteossomo 26S. O ARF ativado, com um domínio do meio rico em resíduos de prolina, serina e treonina (Q), é então liberado para promover a indução da expressão dos genes de respostas a auxina.

### 2.3.3. Tradução de sinal

A tradução do sinal consiste na conversão do sinal em respostas celulares específicas (Coté *et al.*, 1995), como por exemplo, a ativação de genes que induzem a síntese de proteínas-PR e de certas enzimas regulatórias do processo de produção de fitoalexinas e ROS (mecanismos químicos pós-formados).

A seguir será relatada a produção de proteínas-PR e de fitoalexinas, visto que EAO's já foi citado nessa revisão.

#### 2.3.3.1. Proteínas-PR

O termo proteínas-PR (Ps-PRs) se tornou um termo coletivo para todas as proteínas, com função enzimática ou não, que são produzidas após uma infecção por fitopatógenos. Essas proteínas foram descobertas em plantas de fumo *Nicotiana tabacum* L. e atualmente estão agrupadas em 17 famílias as quais estão numeradas de acordo com a ordem que foram descobertas (Van Loon *et al.*, 2006).

As Ps-PRs possuem propriedades físico/químicas características que as diferem das demais proteínas das plantas. São estáveis em meio ácido até pH 2,8 (Van Loon, 1970; Gianinazzi *et al.*, 1977), apresentam uma elevada resistência à ação de proteases ácidas (Pierpoint *et al.*, 1981), estabilidade sob altas temperaturas (em torno de 60-70°C), são monômeros de baixo peso molecular (8 a 50 kDa), com raras exceções, como alguns membros da família PR-6 (Heitz *et al.*, 1993) e possuem um peptídeo-sinal na região N-terminal, a qual é responsável pela translocação dessas proteínas através da membrana do retículo endoplasmático para o vacúolo ou para o espaço intracelular (Bol *et al.*, 1990). Além disso, muitas Ps-PRs mostram atividade antifúngica *in vitro* (Abad *et al.*, 1996), como as  $\beta$ -1,3-glucanases (Postein *et al.*, 1994), as quitinases (Schlumbaum *et al.*, 1986) entre outras. As Ps-PRs quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases possuem atividade antifúngicas sinérgica (Mauch *et al.*, 1988), além de liberarem, por meio de hidrólise, moléculas com atividade eliciadora dos mecanismos de defesa das plantas (Keen & Yoshikawa, 1983; Kurosaki *et al.*, 1986).

As Ps-PRs se acumulam em resposta a um ataque de um microrganismo, tratamento com indutores de resistência ou outro tipo de estresse. Segundo Whalen (2005), as proteínas-PR parecem ser a primeira linha de defesa das plantas devido à rápida ativação dos genes que as codificam.

A estrutura das proteínas da família PR-1 é fortemente conservada em várias plantas chegando a 35% de homologia. Tais proteínas possuem homologia inclusive com proteínas de fungos, insetos e vertebrados (o homem inclusive) (Van Loon *et al.*, 2006).

A família PR-2 compreende as glucanases e as famílias PR-3, PR-4, PR-8, PR-11 as quitinases, todas possuindo atividade contra fungos. As proteínas dessas famílias possuem um mecanismo de ação hidrolítico sobre a parede celular de fungos e bactérias (Yoshikawa *et al.*, 1993).

As proteínas  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases têm sido detectadas em várias plantas após a ativação com um indutor. As quitinases da classe III, pertencentes à família PR-8, possuem atividade enzimática adicional semelhante à lisozima, catalisando a hidrólise do polímero peptídeoglicano, componente estrutural das paredes celulares de bactérias (Fritig *et al.*, 1998).

Já as quitinases, hidrolisam a quitina, a qual é definida como um polímero de N-acetil-D-glucosamina com ligações  $\beta$ -1,4 e é encontrada embebida numa matriz de fibras de glucana com proteínas e carboidratos. Poucos fungos são sensíveis a quitinase isoladamente, porém muitos são sensíveis a combinação desta com a  $\beta$ -1,3-endoglucanase (Stahl & Bishop, 2000).

As PR-7 são endoproteínases que atuam na dissolução da parede celular de vários microrganismos. A família PR-6 compreende inibidores de proteínases as quais atuam contra nematóides e insetos (Garcia-Olmedo *et al.*, 1987), enquanto que as proteínas-PR da família PR-5 exibem atividade antifúngica direta a diferentes gêneros de fungos, interagindo com a MP de suas células (Vigers *et al.*, 1992).

As peroxidases pertencem à família PR-9 e são glicoproteínas antioxidantes capazes de catalisar um grande número de reações como, produção ou catálise de  $H_2O_2$ , formação de lignina, suberização, catabolismo de auxinas e cicatrização de ferimentos (Alvarez *et al.*, 1998).

A lignificação da parede celular propicia uma barreira física ao avanço do fitopatógeno, impedindo que as enzimas hidrolíticas secretadas por estes dissolvam as células vegetais. A indução da lignificação tem sido relacionada como uma resposta de defesa em hospedeiros suscetíveis (Sticher *et al.*, 1997).

#### 2.3.3.2. *Fitoalexinas*

As fitoalexinas são metabólitos secundários, antimicrobianos, de baixa massa molecular, produzidas pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. São capazes de impedir ou reduzir a atividade de agentes patogênicos, sendo a taxa de produção/acúmulo dependentes do genótipo do hospedeiro e/ou patógeno (Daniel & Purkayastha, 1996). São considerados biocidas, sendo prejudiciais para bactérias, fungos, nematóides, plantas e animais. De forma geral, o modo de ação das fitoalexinas sobre os fungos inclui a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da MP e inibição de enzimas fúngicas. Esses efeitos refletem-se na inibição da germinação e alongação do tubo germinativo e redução ou inibição do crescimento micelial (Lo *et al.*, 1996).

As propriedades antimicrobianas das fitoalexinas sugerem que elas são importantes componentes do repertório de defesa das plantas. As fitoalexinas são ausentes em tecidos sadios e se acumulam após a infecção por fungos ou bactérias em mono e dicotiledôneas (Kuc, 1995; Smith, 1996).

As fitoalexinas apresentam grande variedade de estruturas químicas, e mais de trezentos tipos já foram caracterizadas, entre diferentes classes de compostos químicos, como cumarina, diterpeno e flavonóide, entre outras e foram identificadas em mais de vinte famílias de vegetais. Entretanto, todas as fitoalexinas são lipofílicas, o que permite atravessar o plasmalema, além de interferir no funcionamento normal das membranas como o aumento da perda de eletrólitos (Smith, 1996).

Substâncias de diversas origens podem atuar como eliciadores na indução de fitoalexinas. Os eliciadores de origem microbiana podem ser compostos por fragmentos das paredes celulares de fungos (glucanas, quitosanas, glicoproteínas e polissacarídeos), células bacterianas, partículas virais e homogenados livres de células vegetais. As substâncias bióticas de origem química podem ser os carboidratos, glicoproteínas, polipeptídios, enzimas ou lipídeos. No caso dos eliciadores endógenos, existem os fragmentos da parede celular das plantas (oligogalacturonídeos), os quais são liberados pela ação de enzimas degradadoras de parede, produzidas por fungos e bactérias ou pelas próprias células danificadas da plantas. Além disso, as fitoalexinas podem se acumular nos tecidos em resposta a eliciadores abióticos, que causam estresse na planta, como luz UV, metal pesado ( $\text{HgCl}_2$ ) ou mesmo em consequência de ferimentos (Pascholati & Leite, 1994).

A síntese de fenóis e fitoalexinas fenólicas ocorrem como resultado do desvio de precursores metabólicos primários para as vias de metabólitos secundários (Dixon &

Paiva, 1995; Smith, 1996). O desvio geralmente surge da indução *de novo* de enzimas que controlam pontos-chaves nas vias biossintéticas (Kuc, 1995). Fenilalanina-amônia-ase e chalcona sintase são as principais enzimas que regulam a biossíntese de fitoalexinas derivadas de fenilpropanóides (Dixon & Paiva, 1995). Para fitoalexinas sesquiterpenóides derivadas de mevalonato, hidroximetilglutaril coenzima A redutase, esqualeno sintase e sesquiterpenóide sintase são as enzimas regulatórias-chave (Vogeli & Chappell, 1998; Choi *et al.*, 1994).

## 2.4. Citros

Os citros são plantas nativas do sudeste do continente asiático de onde foram distribuídos para várias partes do mundo. Nas Américas, provavelmente essas plantas foram introduzidas a partir de 1493 através de sementes trazidas por Colombo (Webber *et al.*, 1967). No Brasil, os citros foram introduzidos por volta de 1530 com o primeiro relato em Cananéia (SP), expandindo-se para outras partes do Brasil rapidamente (Hasse, 1987). O Brasil entrou no século XXI com uma produção de 18,5 milhões de toneladas de citros, sendo o maior produtor e exportador de suco concentrado e congelado (Amaro & Salva, 2001).

As plantas cítricas são as fruteiras mais cultivadas no mundo (FNP, 2006). O agronegócio de citros, juntamente com o da cana-de-açúcar, celulose e de grãos vem se mantendo como um dos mais competitivos, com melhor remuneração do produtor por hectare cultivado e, proporcionalmente aos demais, gerando mais empregos. A citricultura brasileira apresenta números expressivos que traduzem a grande importância econômica e social que a atividade tem para a economia do país.

Atualmente, o Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial de laranja (FAO, 2005). Somente na safra 2007/2008 o Brasil exportou cerca de um milhão de toneladas de suco concentrado de laranja e 50 mil do produto *in natura* (SECEX, 2008).

As exportações brasileiras de suco de laranja superaram R\$2 bilhões pela primeira vez na história na safra 2006/07. O faturamento da indústria processadora com as vendas externas totais atingiu US\$ 2,01 bilhão na safra passada, alta de 64,78% sobre o US\$ 1,22 bilhão movimentado na safra 2005/2006, de acordo com dados da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Se consideradas apenas as exportações de suco de laranja concentrado e

congelado, o faturamento da indústria cresceu 70,75% na safra 2006, em comparação com a anterior (ABECITRUS, 2007).

O perfil da citricultura brasileira mudou na última década. Além da migração do cultivo para o sudoeste de São Paulo, maior produtor brasileiro, as regiões Sul e Nordeste têm cada vez maior participação na produção brasileira de laranja. São Paulo é o principal produtor nacional de laranja e possui o maior pomar do mundo, com 691,26 mil hectares e cerca de 200 milhões de pés. A produção alcançou 368,2 milhões de caixas de 40,8 quilos em 2007 (GCONCI, 2008). Esses dados demonstram que o agronegócio citrícola tem contribuído nos sucessivos superávits comerciais no Brasil, gerando divisas e ao mesmo tempo empregos.

Além do Estado de São Paulo, os principais Estados produtores são: Sergipe, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina (ABECITRUS, 2008).

A citricultura no Estado do Paraná ganhou dimensão econômica a partir do fim da década de 80, quando o governo paranaense rompeu com o *lobby* paulista e estimulou a produção de citros vinculada à industrialização (Casado, 2004). Os produtores da região norte do Paraná obtiveram produção recorde de laranja em 2008/2009. Até o final de dezembro, 270 produtores de laranja, associados da Corol Cooperativa Agroindustrial de 43 municípios, colheram mais de 2,5 milhões de caixas da fruta. Na indústria de transformação, elas foram convertidas em aproximadamente 9 mil toneladas de suco concentrado, que é comercializado com a Europa, Israel e Chile (GCONCI, 2009).

Apesar das condições climáticas e de cultivo serem apropriadas, a produtividade brasileira ainda é baixa quando comparada a outros países (duas caixas de 40,8 kg/planta/ano no Brasil, contra seis na Flórida), o que pode ser atribuído a fatores como pragas, doenças e ausência de irrigação (Amaro *et al.*, 2001).

A grande maioria dos problemas fitossanitários que atualmente desafia a citricultura reflete uma estratégia de expansão acelerada, muitas vezes sem a devida atenção quanto a fatores limitantes de ordem biótica e abiótica. Os principais fatores bióticos limitantes aos citros incluem a clorose variegada dos citros (CVC), o cancro cítrico, a leprose, a tristeza, a pinta preta, a morte súbita, diversas pragas, e mais recentemente o *huanglongbing* (ex-greening). Além desses fatores bióticos externos merecem destaque aqueles relacionados com características próprias do grupo, as quais necessitam melhor conhecimento para apoiar futuros trabalhos de melhoramento, como

qualidade do fruto (cor, composição e valor nutricional). Entre os fatores abióticos destacam-se aspectos nutricionais e estresse.

As doenças podem ser consideradas os fatores mais limitantes ao aumento e manutenção da produtividade em várias áreas de produção de citros do mundo. Tais fatores são mais limitantes quanto maior a extensão dos plantios mono específicos e monoclonais, e são normalmente agravados por outros fatores abióticos. Dentre as características associadas à severidade das pragas e doenças em citros estão, a estreita base genética sobre a qual se apóia a citricultura, a alta plasticidade genotípica do grupo com grande capacidade de adaptação a diferentes condições, inclusive as novas interações bióticas (novos patógenos), e práticas de propagação, especialmente a enxertia de borbulhas e sementes com embriões nucelares.

## **2.5. Clorose variegada dos citros (CVC)**

Em 1987, foram observadas pela primeira vez, laranjeiras com sintomas ainda desconhecidos no sudoeste de Minas Gerais e no norte do Estado de São Paulo (De Negri, 1990). Essa nova doença foi denominada “amarelinho” ou clorose variegada dos citros (CVC). Nessas plantas sintomáticas foi detectada a presença de bactérias associadas ao xilema, e sua morfologia assemelhava-se à bactéria *X. fastidiosa*, causadora do mal de Pierce em videiras. Em análise por microscopia eletrônica dessas bactérias limitadas ao xilema, admitiu-se a hipótese da bactéria *X. fastidiosa* ser o agente causal da CVC (Rossetti *et al.*, 1990).

A CVC é uma das principais e mais sérias doenças na citricultura brasileira e se encontra disseminada praticamente em todos os Estados produtores de citros (Laranjeira, 1997). No último levantamento realizado pelo Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura) no ano de 2006, 19 anos após ser constatada em São Paulo, 47% dos pomares do Estado apresentavam pelo menos uma planta com algum sintoma de CVC, sendo as regiões Norte e Centro do Estado as mais afetadas, com respectivamente 60,73% e 54,66% dos pomares com plantas doentes ([www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)).

Os sintomas típicos da CVC incluem pequenas manchas internervais amarelas na face superior da folha que inicialmente não são muito extensas. As cloroses na face inferior da folha correspondem às manchas variando entre o vermelho e o marrom. Quando as folhas ficam mais velhas, as áreas que apresentam essas lesões podem coalescer e necrosar (Rossetti & De Negri, 1990) (Figuras 2A, B e C). Em plantas muito afetadas,

ocorre atrofia da copa, desfolhas dos ramos mais altos, morte dos ponteiros, encurtamento de internódios, podendo ocorrer a murcha dos ramos (Figuras 2D). As gemas dos ramos afetados tendem a brotar com mais frequência e vigor formando novos ramos doentes, portanto, debilitando ainda mais a planta (Laranjeira, 1997).

Após os sintomas foliares, surgem os sintomas nos frutos que estão presentes nos ramos sintomáticos, havendo uma tendência à frutificação em “pencas” (Rossetti & De Negri, 1990; Laranjeira, 1997) (Figura 2E). Os frutos afetados apresentam redução no tamanho, ficam endurecidos e com deficiência de potássio (Figura 2F). Outras características dos frutos doentes são o amarelecimento precoce, surgimento de lesões marrom-escuras (tipo queimadura) podendo estar relacionado ao fato dos frutos apresentarem casca fina (Laranjeira, 1997). Essas características prejudicam a produção de suco e até mesmo o consumo *in natura*



**Figura 2.** Sintomas da clorose variegada do citros (CVC). A, B e C: sintomas foliares; D: sintomas de desfolha de ramos. E: sintomas dos frutos em “penca”. F: mostrando a diferença dos frutos sadios e doentes. (Fonte: H.D. Coletta Filho).

A transmissão da *X. fastidiosa* causadora da CVC é feita por cigarrinhas (Hemíptera: Cicadellidae) que se alimentam da seiva do xilema das plantas (Hopkins, 1989). As espécies mais importantes em citros são: *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminales* e *Oncometopia faciales* (Lopes, 1996; Roberto *et al.*, 1996). Entretanto, outras cigarrinhas da família Cicadellidae foram comprovadas como sendo



transmissoras em citros, constituindo onze espécies vetoras (Lopes, 1999). Essas cigarrinhas ao se alimentarem da seiva do xilema de plantas infectadas adquirem a bactéria, que também é capaz de se multiplicar no aparelho bucal. Todas as fases de desenvolvimento das cigarrinhas podem transmitir a bactéria, exceto a fase ninfa devido às ecdises (Purcell & Finlay, 1979; Purcell, 1994). Entretanto, a fase adulta é a mais eficiente na transmissão e uma vez adquirida a bactéria, os insetos podem transmiti-la pelo resto de suas vidas (Hill & Purcell, 1995). Embora as cigarrinhas atuem como vetores da *X. fastidiosa*, a eficiência de aquisição e transmissão pode variar em função da espécie, da afinidade com a planta hospedeira (Purcell & Hopkins, 1996; Marucci, 2003) e do local de alimentação nas plantas (Lopes, 1996).

Outra forma de transmissão da *X. fastidiosa* se dá por enxertia de borbulhas infectadas (Jacomino et al., 1993) podendo ser perpetuada da mesma forma (Rosseti et al., 1995; Coletta-Filho et al., 2000). Também foi mostrada a transmissão da bactéria por enxertia natural de raízes (He et al., 2000). Mais recentemente, foi comprovada a presença da *X. fastidiosa* em sementes e frutos de laranja doce com sintomas de CVC que poderiam ser passadas para as plântulas originárias dessas sementes (Li et al., 2003). Não foi constatada a transmissão mecânica dessa bactéria através de objetos cortantes.

Dentro do gênero *Citrus*, as espécies e híbridos que podem apresentar sintomas são: laranjas doces (*Citrus sinensis* Osb.), algumas variedades tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco) e alguns tangores (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus paradisi* Macf.) (Laranjeira et al., 1996). As laranjas doces são os hospedeiros mais suscetíveis da *X. fastidiosa* causadora da CVC, havendo diferenças bastante acentuadas em relação à suscetibilidade (Laranjeira et al., 1995; Li et al., 1996). Segundo Pompeu Jr. et al. (1998), tangerinas, tangores e tangelos apresentam sintomas no campo numa intensidade bem menor que as laranjas doces, embora em tangor “Murcott” e tangerinas ‘Poncan’ e ‘Cravo’, apenas foi constatado a presença da bactéria (Machado et al., 1993). Laranjeira et al. (1995, 1996) não observaram sintomas de CVC em pomares de limões verdadeiros.

Atualmente, quase 20 anos após a constatação da CVC, a convivência com a doença está alicerçada sobre três pontos básicos: produção de mudas e borbulhas em ambientes protegidos, livres do vetor da bactéria; controle químico do vetor através de inseticidas com o intuito de diminuir a população de vetores; diminuição de fonte de inóculo no pomar através de poda sistemática de ramos infectados em plantas com

sintomas iniciais e eliminação das plantas severamente infectadas (Gravena *et al.*, 1997). Apesar dos bons resultados obtidos, estas medidas não têm solucionado definitivamente o problema da CVC. Sem dúvida, a solução definitiva para a CVC seria a utilização de variedades de laranja doces tolerantes ou resistentes à *X. fastidiosa*.

Cruzamentos controlados vêm sendo realizados em citros desde o século XIX, tendo sido obtidos alguns híbridos de importância econômica (Moreira & Pio, 1991). O Centro de Citricultura Sylvio Moreira conta com um intensivo programa de melhoramento de citros visando principalmente resistência à patógenos e estresse hídrico. Dentre os cruzamentos visando resistência a CVC foi obtida uma população de híbridos de laranja “Pera” com tangor “Murcott” (Oliveira *et al.*, 2002). Esta população foi multiplicada clonalmente e uma análise preliminar revelou a existência de diferentes graus de resistência e suscetibilidade à *X. fastidiosa* (Oliveira, 2003; Coletta Filho, 2007). No entanto, há a necessidade de uma avaliação mais detalhada da resposta dos genótipos contrastantes (laranja x tangerina) quanto às características de suscetibilidade, tolerância ou resistência à doença.

## 2.6. *Xylella fastidiosa*

A *X. fastidiosa* foi relatada pela primeira vez em 1973 (Goheen *et al.*, 1973; Hopkins & Mollenhaver, 1973) primeiramente associada à doença de Pierce (PD) em videira. Devido ao crescimento lento e necessidade de um vetor para sua disseminação foi inicialmente classificada como próxima a *Rochalemea quintana*, ou “rickettsiae”-like. Porém, estudos comparativos de composição de DNA indicaram que a proporção C+G variava entre 49,5-53,1mol% e o tamanho do genoma entre 1,92- 2,42 x 10<sup>3</sup> kb. Enquanto *R. quintana* a porcentagem é de 38,5 mol%, o que indica que as bactéria limitadas ao xilema não são aparentadas a *R. quintana* (Hopkins & Mollenhaver, 1973).

Posteriormente, estudos através da análise de 16S RNA indicaram similaridades com o subgrupo gamma das eubactérias, que incluem o gênero *Xanthomonas*. Porém as diferenças fenotípicas e genotípicas permitiram sua classificação em um novo gênero, o qual inclui todas as estirpes de bactérias fastidiosas, limitadas ao xilema e gram-negativas em uma só espécie *X. fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987).

Em 1991, a identidade da *X. fastidiosa* associada à CVC foi confirmada por Leite Junior e Leite. No entanto, só em 1993, o postulado de Koch foi cumprido (Lee *et*

al., 1993; Chang et al., 1993) e confirmado posteriormente (Hartung *et al.*, 1994), determinando assim a *X. fastidiosa* como o agente causal da CVC.

Recentemente, foi proposta a divisão da espécie *X. fastidiosa* em três subespécies através da comparação das seqüências das regiões espaçadoras entre os genes 16S e 23S (ITS). A primeira subespécie, *fastidiosa*, incluiria cepas de videira, alfavaca, duas amendoeiras e arce, com 85% de identidade entre elas. A segunda, *multiplex*, com 84% de identidade, compreendia as estirpes de pêssigo, ulmeiro, ameixa, videira “pigeon”; plátamo e amendoeira. E a terceira subespécie, *pauca*, incluiria somente as estirpes de citros com 87% de identidade (Schaad et al., 2004).

A *X. fastidiosa* é uma bactéria Gram-negativa, com formato de bastonete e de tamanho variável, medindo aproximadamente 0,3-0,5 µm de diâmetro e 1-5 µm de comprimento (Chagas *et al.*, 1992). Caracteriza-se pelo crescimento lento em meio de cultura, sendo suas colônias circulares, discretas, medindo até 0,6 mm de diâmetro após 10 dias de incubação a 28°C, podendo alcançar 1,5 mm depois de 30 dias, com variações decorrentes do meio de cultura utilizado (Coletta-Filho, 2002). Essa bactéria não apresenta motilidade devido à falta de flagelos, também não apresenta pigmentação e é aeróbica. Seu crescimento se dá na condição de 26 e 28°C com pH ótimo entre 6,5 e 6,9, não hidrolisa gelatina, utiliza hipurato, não fermenta glicose, sendo negativa para indol, H<sub>2</sub>S, lipase, amilase, fosfatase e b-galactosidase, mas positiva para catalase e hidrólise de amido (Lacava & Miranda, 2000). O conteúdo de guanina e citosina (G+C) é de 52,7% (Simpson *et al.*, 2000). Essa bactéria é sensível a polimixina, cloranfenicol, tetraciclina, netilmicina (Miranda & Lacava, 2000), gentamicina e canamicina (Ribeiro, 2002).

Ela é limitada ao xilema das plantas hospedeiras, sendo encontrada em raízes, caules, folhas, frutos e sementes (Hopkins, 1989; Purcel & Hopkins, 1996; Beretta *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003). Coloniza, ainda, o lúmen do canal alimentar de insetos vetores (cigarrinhas) (Hopkins, 1995). Possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo membros de pelo menos 28 famílias de plantas mono e dicotiledôneas (Freitag, 1951; Raju & Wells, 1986; Wells *et al.*, 1987; Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996).

*X. fastidiosa* é causadora de doenças em culturas de grande importância econômica, dentre elas estão a alfafa, amendoeira, ameixeiras japonesas, amoreira, cafeeiro, carvalho, citros, espirradeira, olmo, pecan, pessegueiro, pereira e videira (Goheen *et al.*, 1973; Hopkins & Mollenhauer, 1973; Kitajima *et al.*, 1975; Mircetich *et*

*al.*, 1976; Hearon *et al.*, 1980; Rossetti *et al.*, 1990; Leu & Su, 1993; Paradela Filho *et al.*, 1995; Purcel & Saunders, 1999; Sanderlin & Heyderich-Alger, 2000).

A *X. fastidiosa* foi o primeiro patógeno de planta a ter seu genoma completamente seqüenciado. O isolado seqüenciado foi 9a5c obtido de laranja Valência. O genoma dessa bactéria é composto de um cromossomo de 2.679.305 pares de base (pb) com um conteúdo de 52,7% de G+C (guanina e citosina), e dois plasmídeos, um com 51.158 pb, possuindo 49,6% de G+C e outro com 1.285 pb contendo 55,6% de G+C, onde estão codificadas potencialmente 2.448 proteínas, sendo 48% delas semelhantes a proteínas já descritas em outros organismos (Simpson *et al.*, 2000). Essas proteínas homólogas foram categorizadas em diferentes grupos funcionais (<http://www.xylella.Incc.br>). Dentre essas categorias, 147 proteínas foram associadas estando envolvidas na patogenicidade, virulência e adaptação.

O genoma da *X. fastidiosa* apresenta cerca de 7% de sequências homólogas a de fagos, o que explicaria a grande diversidade entre as estirpes, admitindo-se que os bacteriófagos são considerados mediadores da evolução e da transferência de fatores de virulência sendo responsável pelo surgimento de novas espécies (Simpson *et al.*, 2000).

O sistema de transporte parece ser o componente central das interações patógeno/hospedeiro. Em *X. fastidiosa* foram encontrados cerca de 140 ORFS codificando proteínas relacionadas ao transporte, dos quais, 66 genes parecem estar relacionados ao metabolismo de ferro. Esses genes aparentemente podem estar associados à absorção de micronutrientes no xilema, contribuindo na redução de ferro e outros íons de transição, o que poderia contribuir para os sintomas típicos da doença nas folhas (Simpson *et al.*, 2000).

Curiosamente, não foram encontrados no genoma da *X. fastidiosa* os genes responsáveis pela especificidade planta/patógeno que geralmente são encontrados em bactérias fitopatogênicas. Esses genes de avirulência (*avr*) presentes nos patógenos interagem com as proteínas de resistência do hospedeiro (R) (Baker *et al.*, 1997). Acreditava-se que esses genes poderiam estar entre os genes com função ainda não determinada. No entanto, isso não seria possível já que os genes *avr* são dependentes do sistema de secreção tipo III e são extremamente conservados, descartando assim essa hipótese. A ausência de genes *avr* pode ser explicada pelo modo de vida dessa bactéria e tipo de transmissão, que não necessitam de invasão das células dos hospedeiros para a sua infecção e sobrevivência (Dow & Daniels, 2000; Lambais *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2000).

Antes do sequenciamento do genoma, as informações sobre seu mecanismo de patogenicidade não eram bem esclarecidas. Acreditava-se que a oclusão do xilema pelas bactérias, tiloses e goma, além da produção de fitotoxinas e o desbalanço de reguladores de crescimento, seriam responsáveis pela patogenicidade da *X. fastidiosa* (Hopkins, 1989). No entanto, nenhum experimento conseguiu comprovar ou excluir nenhuma dessas hipóteses. Com a publicação do genoma e baseado nos sintomas da CVC, puderam-se esclarecer algumas hipóteses sobre os mecanismos envolvidos na patogenicidade da *X. fastidiosa*.

Uma das hipóteses sobre os mecanismos está relacionada à produção de exoenzimas que degradam a parede celular, sendo três endo-1,4- $\beta$ -glucanases e uma celobiohidrolase. A ação dessas enzimas promove a movimentação da bactéria entre os vasos através da degradação das membranas laterais do xilema. Foi demonstrado que essa movimentação está associada à patogenicidade da *X. fastidiosa* causadora da doença de “Pierce” e de CVC (Hopkins, 1985; Almeida *et al.*, 2001).

A *X. fastidiosa* produz ainda uma grande quantidade de toxinas que provavelmente estão relacionadas aos sintomas foliares. Entre essas, foram encontradas cinco similares a hemolisinas, sendo quatro delas pertencentes à família de toxinas RTX que são importantes fatores de virulência, com ampla disseminação em bactérias gram-negativas (Coote, 1992). Também foram encontrados no genoma genes que codificam colicina V, um polipeptídeo tóxico que age em bactérias sensíveis. Além dessas toxinas, apesar de não possuir as vias completas, foi verificado a presença de alguns policetídeos, uma importante classe de toxinas (Simpson *et al.*, 2000).

O genoma revelou, ainda, genes relacionados à resistência a estresse osmótico, estresse oxidativo e um eficiente sistema de absorção de nutrientes, uma vez que o xilema é um ambiente pobre em nutrientes. Além desses, houve a identificação de alguns genes envolvidos com a resistência a compostos antimicrobianos, sugerindo que essa bactéria possa apresentar um mecanismo de defesa contra toxinas ou antibióticos produzidos por endofíticos encontrados no xilema. Esses genes podem desempenhar um importante papel na interação da bactéria com o hospedeiro, conferindo vantagens competitivas no ambiente colonizado que contribuam para a sua adaptação (Simpson *et al.*, 2000).

O mecanismo de patogenicidade mais sugerido e pesquisado está relacionado ao bloqueio dos vasos xilemáticos através de agregados da bactéria, produção de polissacarídeos e tiloses. Essa hipótese é sustentada devido aos hospedeiros infectados

apresentarem sintomas típicos de estresse hídrico. A *X. fastidiosa* deve possuir um importante mecanismo de agregação entre as células e a parede dos vasos colonizados, uma vez que habita micro-ambientes específicos, como o xilema e o canal alimentar do vetor, que estão sujeitos a uma forte turbulência e pressão (Hopkins, 1989).

Em relação à hipótese envolvendo o bloqueio dos vasos do xilema, foram detectados vários genes cujos produtos são responsáveis pela adesão na superfície dos vasos do xilema do hospedeiro e do cibário do vetor, inclusive genes que até o momento só haviam sido detectados apenas no processo de adesão de patógenos de humanos (Simpson *et al.*, 2000). Através de micro-análises por raios-X dos agregados da *X. fastidiosa in planta* e *in vitro*, admite-se que a adesão dessa bactéria ocorre por interações entre as cargas negativas da parede do xilema e os grupos tiol (SR) da membrana externa da bactéria. Esses grupos tiol também promovem a agregação das bactérias por meio da formação de pontes de dissulfeto entre os grupos presentes nas membranas das células vizinhas (Leite *et al.*, 2002). A adesão e agregação das bactérias aos vasos do xilema podem ser ainda mediadas por estruturas tipo fímbrias, que são visualizadas por microscopia eletrônica da *X. fastidiosa* tanto na planta como no inseto vetor. No genoma dessa bactéria foram detectados 26 genes relacionados à biossíntese e função de filamentos de fímbrias (Simpson *et al.*, 2000). Também foi descrita uma via completa para a síntese de um exopolissacarídeo (EPS) denominado “goma fastidiana” (da Silva *et al.*, 2001). Esse EPS promove a proteção das células contra fatores de defesa do hospedeiro, como toxinas e antibióticos, tendo um importante papel na adaptação da bactéria (O’ Toole *et al.*, 2000).

Contudo, estudos de genoma funcional são necessários para comprovar essas hipóteses sobre a patogenicidade da *X. fastidiosa*.

## **2.7. Citros e a *Xylella fastidiosa***

Plantas com CVC demonstram alta correlação entre os sintomas da doença e distúrbios causados pelo estresse hídrico, concordando com a hipótese do bloqueio dos vasos do xilema causado pela *X. fastidiosa* (Machado *et al.*, 1994).

Em um trabalho realizado para o entendimento das respostas genéticas resultantes de trocas fisiológicas que ocorrem na planta infectada com CVC, a análise comparativa de expressão da biblioteca de ESTs (Expressed Sequence Tags) de laranja doce não infectada e com sintomas de CVC demonstrou que, em plantas infectadas com

*X. fastidiosa*, houve repressão de genes associados ao metabolismo, fotossíntese, modificação de proteínas e facilitação de transporte (Souza *et al.*, 2007ab).

A maioria dos genes com regulação positiva foi associada com metabolismo e resposta de defesa. Alguns desses transcritos foram categorizados funcionalmente como metabolismo de carboidratos. Um desses transcritos foi detectado como codificando para uma xiloglucana endotransglicolase/hidrolase. Esta enzima em outros organismos desempenha uma importante função na alteração das propriedades de parede celular em resposta a estresses ambientais (Braam *et al.*, 1997). Também foram encontrados genes codificando proteínas relacionadas a estresses, como peroxidase, superóxido dismutase, lipoxigenase, lipase, proteínas parecidas com isoflavona redutase e outras. Transcritos representando genes envolvidos com estresse oxidativo também foram positivamente regulados em plantas com CVC, como as peroxidases e superóxido dismutase cobre/zinco (SODC). Além desses, alguns transcritos associados à adaptação foram expressos em plantas com CVC e poderiam explicar porque as plantas permanecem vivas sobre severos estresses hídricos e nutricionais. Alguns desses genes positivamente regulados são relacionados à resposta de defesa, sugerindo que as plantas de laranja doce ativam seus mecanismos de defesa. No entanto, eles aparentemente não são suficientes para evitar a doença. Esses genes podem ser expressos como parte de uma resposta secundária devido a efeitos fisiológicos causados pela infecção (Souza *et al.*, 2007ab).

Adicionalmente, Souza e colaboradores (2007ab) verificaram que muitos dos genes relacionados à fotossíntese foram reprimidos. Esse fato foi possivelmente reflexo do fenótipo de degradação de clorofila observado em plantas com CVC. No entanto, laranjas doces infectadas com *X. fastidiosa* sem sintomas, apresentaram regulação positiva de diversos genes associados com fotossíntese, provavelmente como resultado de respostas gênicas da planta ao dano causado pela bactéria. Vários dos genes candidatos encontrados nessas avaliações foram validados nesse trabalho.

## **2.8. Análise de expressão gênica**

### 2.8.1 Hibridação subtrativa supressiva

A hibridação subtrativa supressiva (SSH) de populações de cDNA, seguida de amplificação por PCR dos genes diferencialmente expressos foi desenvolvida por

Diatchenko *et al.* (1996) e Gurskaya *et al.* (1996) e patenteada pela Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, USA). Essa abordagem é uma versão modificada da técnica de hibridação subtrativa de duas populações de cDNA, amplamente utilizada (Hedrick *et al.*, 1984), e pode ser utilizada para comparar duas populações de mRNA e obter cDNA de genes que estão em maior expressão ou que estão se expressando exclusivamente em uma população quando comparada com outra (Desai *et al.*, 2001).

O estudo da expressão gênica diferencial em plantas tem permitido o conhecimento e o entendimento de genes e vias metabólicas para uma série de espécies como girassol (Ouvrard *et al.*, 1996), arroz (Xiong *et al.*, 2001); *Arabidopsis thaliana* (Wilkosz & Schaläppi, 2000), eucalipto (Voiblet *et al.*, 2001), e mais recentemente, em videira (Lin *et al.*, 2007). Em citros, também foram identificados alguns genes diferencialmente expressos, como o gene *dad-1* envolvido na prevenção da programação da morte celular (Moriguchi *et al.*, 2000) e um gene que codifica a enzima ADP-glicose pirofosforilase, essencial durante a biosíntese de amido, sendo importante na regulação do desenvolvimento do fruto e de folhas (Kin *et al.*, 2001).

Uma das principais vantagens desta técnica é a utilização de PCR em combinação com a supressão, ou seja, a técnica incorpora um passo de hibridação que normaliza abundância de seqüências pela normalização da cinética de hibridação durante o processo de subtração. Esta etapa propicia o enriquecimento de mRNAs raros, ou seja, aumenta a probabilidade de se obter cDNAs pouco expressos, simplificando a análise da biblioteca (Rebouças & Gomes, 1999; Desai *et al.*, 2001).

A SSH tem muitas aplicações potenciais em genética molecular, permitindo a identificação de um conjunto de genes que se expressam de modo diferencial, em situações específicas, tais como estresse oxidativo, resposta a patógenos, entre outras, (Rebouças & Gomes, 1999; Desai *et al.*, 2001). A técnica vem sendo utilizada para identificar genes que se expressam em meristemas reprodutivos x vegetativos em *Brassica oleracea* (Palmer *et al.*, 2001), genes de defesa e senescência de folhas em arroz (Xiong *et al.*, 2001), genes relacionados com a apomixia em citros (Silva, 2002), e genes relacionados com a resposta da planta ao vírus da tristeza dos citros (Bernet *et al.*, 2004, Cristofani *et al.*, 2005). Esses estudos demonstram que esse método baseado em PCR é sensível e eficiente para identificar genes de interesse.

Para a análise dos níveis de mRNA em um mesmo tipo de célula em situações funcionais distintas, o primeiro passo é a extração do RNA total, seguido de purificação do mRNA, síntese de cDNA, digestão dos cDNA com enzimas de restrição, ligação



com adaptadores, hibridação e PCR (Diatchenko *et al.*,1996; Gurskaya *et al.*, 1996; Rebouças & Gomes, 1999; Desai *et al.*, 2001). A purificação do mRNA é realizada utilizando-se colunas de afinidade que contenham oligonucleotídeos com 15 a 17 deoxitimas- (dT)<sub>15-17</sub>, aos quais se fixam os mRNA por meio do estabelecimento de pontes de H entre segmentos de cauda poli-A e os oligonucleotídeos-dT. Os mRNAs com cauda poli-A, são posteriormente eluídos da coluna e usados para síntese de DNA complementar (Rebouças & Gomes, 1999).

A síntese de cDNA é realizada utilizando-se uma transcriptase reversa de origem viral (AMV), uma DNA polimerase que usa RNA como molde, utilizando como segmentos iniciadores oligonucleotídeos contendo sítios de reconhecimento para as endonucleases RsaI e HindIII e uma cauda poli-dT (Rebouças & Gomes, 1999). Após a remoção do molde de RNA, a segunda fita de cDNA é sintetizada com a DNA polimerase I de *Escherichia coli* (Rebouças & Gomes, 1999). O cDNA é sintetizado a partir do RNA extraído de duas fontes de tecido (tais como tecido com a doença e tecido normal). O cDNA da população no qual os transcritos específicos são encontrados é chamado de cDNA *tester* e o cDNA da população referência é chamado de cDNA *driver* (Diatchenko *et al.*,1996).

Numa segunda etapa, cada cDNA é digerido com uma enzima de restrição RsaI, que reconhece uma seqüência de quatro nucleotídeos, para gerar pequenos fragmentos de cDNA (aproximadamente 500 nucleotídeos), de extremidades cegas (extremidade 3' de uma fita coincidente com a extremidade 5' da outra fita de cDNA) (Desai *et al.*, 2001).

O cDNA *tester* é então subdividido em duas porções, ambas tendo todas as moléculas igualmente representadas, e cada uma é ligada a diferentes adaptadores (adaptador 1 e 2R). As extremidades dos adaptadores não são fosforiladas, então somente uma fita de cada adaptador é covalentemente ligada ao terminal 5' dos cDNA pela utilização de DNA ligase (Desai *et al.*, 2001). As duas moléculas adaptadoras têm um segmento comum na extremidade 5'. Os fragmentos do cDNA controle ou *driver*, não recebem os adaptadores (Rebouças & Gomes, 1999).

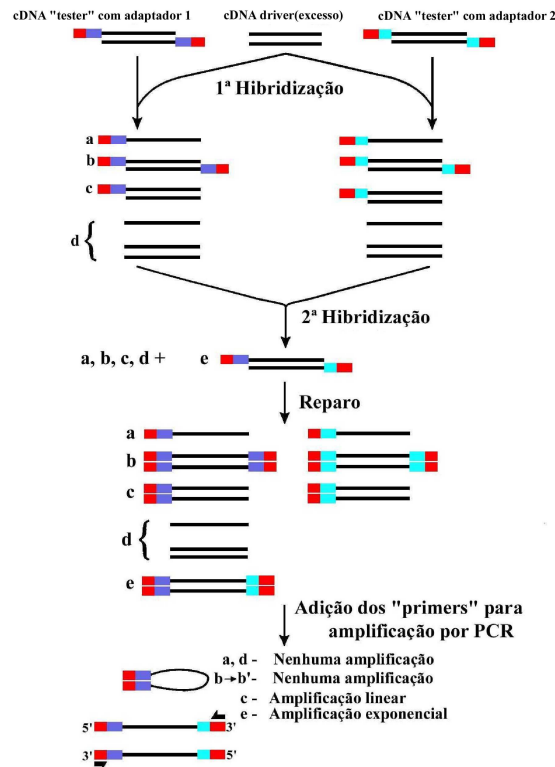
Em seguida são realizados dois ciclos de hibridização e PCR, quando as moléculas de cDNA controle ou *driver*, previamente desnaturadas, são colocadas em contato com as duas subpopulações de cDNA *tester*, previamente desnaturadas separadamente (Rebouças & Gomes, 1999). Na primeira hibridação, o cDNA *driver* é adicionado em excesso em cada amostra do cDNA *tester*. Essa solução é incubada em

condições de temperatura e meio adequados, de forma que o movimento térmico aleatório das fitas de DNA permita o pareamento das moléculas complementares, que estabelecem pontes de H entre si, com pareamento estável. As moléculas do cDNA *tester* ligadas aos adaptadores 1 ou 2R, que são comuns e igualmente abundantes nas duas populações (*tester* e *driver*) terão grande chance de formar dupla fita com moléculas do cDNA *driver* ou controle. Esse processo normaliza a população de cDNA que correspondem as moléculas de mRNA muito e pouco abundantes, uma vez que as moléculas mais abundantes encontram um par complementar muito mais rapidamente que as moléculas pouco abundantes (Rebouças & Gomes, 1999). No final desse processo há a formação de diferentes moléculas representadas na Figura 3.

Posteriormente as duas sub-populações de cDNA *tester* são submetidas a mais um processo de subtração das moléculas comuns ao cDNA *driver* ou controle, através da adição de mais cDNA *driver* desnaturado, sem nova desnaturação do dos cDNA *tester*. Após essa segunda subtração, as duas porções de cDNA *tester* são colocadas em contato e incubadas de forma a propiciar o pareamento das moléculas complementares que não formaram duplas fitas com moléculas das populações de cDNA controle por estarem em menor proporção na população, sendo essas as moléculas de interesse (Figura 3). Ao final desse processo de hibridização subtrativa seguida de pareamento das moléculas residuais das duas alíquotas contendo os adaptadores 1 e 2R nas extremidades 5', as extremidades 3' são completadas através da utilização de DNA polimerase I na presença de dNTPs, quando são adicionados a essas extremidades os segmentos complementares ao adaptador (1 ou 2R) presente na molécula complementar (Figura 3).

As moléculas de cDNA do tipo “e” (Figura 3), que possuem os adaptadores 1 e 2R nas suas extremidades, são exponencialmente amplificadas por PCR pela utilização de *primers* que pareiam com ambos os adaptadores. Para aumentar a eficiência do processo de amplificação das moléculas de cDNA diferencialmente expressas, é realizada uma segunda PCR (Nested PCR), com *primers* que pareiam mais internamente nas moléculas molde (Diatchenko *et al.*, 1996; Rebouças & Gomes, 1999).

Os produtos da PCR são submetidos à eletroforese, e os fragmentos são cortados do gel. O cDNA é então extraído do gel para inserção em vetor a ser propagado por *E. coli*. Os clones obtidos são seqüenciados e as seqüências obtidas podem ser comparadas com seqüências homólogas encontradas no banco de dados do GeneBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



**Figura 3:** Diagrama para a hibridização subtrativa. As letras correspondem aos tipos de moléculas presentes nas amostras de cDNA. As moléculas **a** e **d** não possuem sítios para parearem com o *primer*; as moléculas **c** serão amplificadas linearmente, pois apenas uma das fitas tem sítio para pareamento na extremidade 3', as moléculas **b** não serão amplificadas porque há grande chance de pareamento das extremidades 3' e 5' da mesma molécula formando uma estrutura na forma de alça (efeito supressivo). As moléculas que serão exponencialmente amplificadas por terem adaptadores diferentes nas extremidades 3' e 5' e possuem sítios para o pareamento do *primer* nas extremidades 3'. (Adaptado do manual da Clontech para *PCR – Select™ cDNA Subtraction Kit*).

### 2.8.2. Sequenciamento de nova geração

O potencial de identificação de novos genes com os novos sistemas de sequenciamento é especialmente importante quando se deseja conhecer genes funcionais em tipos celulares restritos. Nesses casos, utilizando os métodos convencionais de sequenciamento, um grande número de bibliotecas deve ser construído e muitos ESTs devem ser sequenciados para maximizar a chance de encontrar os genes de interesse. Já com o sequenciamento livre de clonagem bacteriana,

genes de células específicas podem ser facilmente identificados (Carvalho & Silva, 2010).

As novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração, começaram a ser comercializadas em 2005 e estão evoluindo rapidamente. Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Dentre as novas plataformas de sequenciamento, duas já possuem ampla utilização em todo o mundo: a plataforma 454 FLX da Roche e a Solexa da Illumina. Outros dois sistemas de sequenciamento que começam a ser utilizados são a plataforma da *Applied Biosystems*, denominada *SOLiD System*, e o *Heliscope True Single Molecule Sequencing* (tSMS), da Helicos (Carvalho & Silva, 2010). Essas novas plataformas possuem como características comuns um poder de gerar informação muitas vezes maior que o sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento. Essa maior eficiência advém do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não precisando mais do intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, da montagem das placas de sequenciamento e da separação dos fragmentos em géis. A clonagem *in vitro* em suporte sólido permite que milhares de leituras possam ser produzidas de uma só vez com a plataforma 454, Solexa ou SOLiD (Carvalho & Silva, 2010).

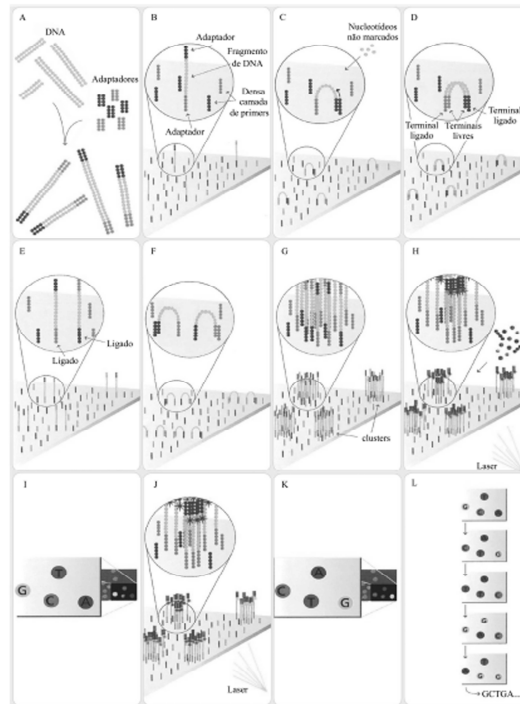
#### Plataforma Solexa

O sequenciamento na plataforma Solexa, assim como o sequenciamento de Sanger, é realizado por síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A inovação dessa plataforma consistiu na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (Fedurco *et al.*, 2006; Turcatti *et al.*, 2008). A superfície de clonagem (*flow cells*) é dividida em oito linhas que podem ser utilizadas para o sequenciamento de até oito bibliotecas. Em cada linha, adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização (Figura 4).

Os fragmentos de DNA da amostra também são ligados aos adaptadores em ambas as extremidades, o que permite sua fixação ao suporte de sequenciamento por hibridização a um dos adaptadores fixados (Figura 4). No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A alta densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos imobilizados a sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de anelamento. Após o ciclo de anelamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em “ponte”. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos 35 vezes e assim as cerca de mil cópias geradas de cada fragmento nessa PCR de fase sólida permanecem próximas umas das outras, formando um *cluster* de sequenciamento. Etapas de desnaturação são necessárias para a separação dos duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada *cluster*.

A alta densidade dos *clusters* de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Até 50 milhões de *clusters* podem ser produzidos por linha, correspondendo a uma representação satisfatória da biblioteca. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada.

Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. Em geral, leituras de 25-35 bases são obtidas de cada *cluster* (Shendure & Ji, 2008).



**Figura 4.** Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina. O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de anelamento (C), no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como *primer* (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de anelamento (F), formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série desses ciclos, serão obtidos *clusters* de moléculas idênticas ligadas ao suporte (G). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (H), é gerado sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeo marcado, excitação e leitura é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada *cluster* (L).

As novas plataformas de sequenciamento, em um futuro bem próximo, revolucionarão o conhecimento sobre o genoma das plantas, principalmente no que concerne ao estudo de variantes alélicas, SNPs, ao desenvolvimento de marcadores para seleção assistida e à clonagem baseada em mapeamento, representando uma importante ferramenta no melhoramento vegetal. Essa revolução será possível com o avanço tecnológico das próprias plataformas de sequenciamento, produzindo leituras maiores, avanço das ferramentas de análise de leituras curtas e montagem de sequências.

O que parece estar cada vez mais evidente é, na verdade, o potencial de uso imediato dessas tecnologias na genômica funcional com o estudo de transcriptomas que vão desde organismos completos até células individuais (Andreas *et al.*, 2007; Tang *et al.* 2009). Todas as plataformas de sequenciamento da segunda geração podem ser utilizadas no sequenciamento de transcriptomas ou RNA-seq. A maior parte dos estudos de transcriptomas em plantas é realizada utilizando os microarranjos de DNA, os quais, além de depender de um conhecimento genômico prévio e de serem influenciados pelo elevado ruído de fundo, possuem ainda uma faixa de detecção de expressão limitada quando comparada às novas plataformas de sequenciamento (~100 vezes *versus* 9.000 vezes) (Marioni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009).

O grande sucesso das novas tecnologias na transcriptômica se deve também ao fato de que estas possibilitam a superação de uma das maiores limitações dos projetos ESTs – a brusca redução no número de sequências novas amostradas com o aumento na quantidade de informação sequenciada. No estudo do transcriptoma de plântulas de *Arabidopsis*, foram identificados 16.000 novos ESTs ainda não caracterizados no dbESTs dos quais pelo menos 60 representam genes ainda não anotados, conferindo maior confiabilidade aos dados principalmente com relação à quantificação dos níveis de expressão gênica, os quais dependem muito do efeito de amostragem (Andreas *et al.*, 2007).

Adicionalmente, o sequenciamento de ESTs representa certamente uma estratégia de sucesso para obtenção de informação genômica das plantas a partir das novas plataformas de sequenciamento. Ele reduz os problemas de montagem associados às leituras curtas (Emrich *et al.*, 2007) e pode ser ainda mais informativo, uma vez que mais informação é produzida e sequências de baixa expressão são também amostradas (não há efeito de clonagem bacteriana). Além disso, o custo do sequenciamento de ESTs é menor com as novas plataformas de sequenciamento, uma vez que não depende da construção de bibliotecas de cDNA para cada um dos tecidos amostrados.

### 2.8.3. PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A técnica de PCR quantitativo em tempo real é um dos métodos mais utilizados para a quantificação de genes devido à sua dinamicidade, sensibilidade, especificidade, não necessidade de processos pós-amplificação e alta reprodutibilidade (Wong & Medrano, 2005). Essa metodologia passou a ser utilizada para monitorar expressão gênica em plantas (Gachon *et al.*, 2004) considerando sua grande habilidade em discriminar genes relacionados e de baixa expressão (Czechowski *et al.*, 2004).

O RT-qPCR difere do PCR clássico por detectar o produto de reação a cada ciclo durante a reação. Assim, esta técnica permite o acompanhamento da amplificação durante a fase exponencial da reação e uma determinação precisa da quantidade de material presente (Gachon *et al.*, 2004). Existem diversos métodos de detecção que podem ser utilizados no PCR em tempo real, dentre estes, os mais comuns são o *SYBR Green*, *TaqMan* e *Molecular Beacons*.

O *SYBR Green* se liga entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico emite uma fluorescência verde. A sua grande vantagem é o baixo custo, facilidade de uso e sensibilidade. Contudo, como esta molécula se liga a qualquer fita dupla de DNA, podem ocorrer produtos inespecíficos superestimando a presença do alvo. Entretanto, a utilização desse fluoróforo permite ao final da PCR fazer uma curva de dissociação, onde pode-se verificar se houve ou não amplificações inespecíficas (Novais & Pires-Alves, 2004).

A *TaqMan* é uma sonda (fragmento de DNA marcado usado para hibridizar outra molécula de DNA) utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Essa sonda contém uma molécula *reporter* (de emissão) e uma molécula *quencher* (de extinção). Quando estas duas moléculas estão próximas fisicamente, a emissão da fluorescência é anulada, portanto, não há detecção de fluorescência. Durante a amplificação a sonda é degradada, afastando o *reporter* do *quencher* e, assim ocorrendo à emissão do sinal fluorescente, que é captado por uma câmera digital e transmitido para um programa computacional (Novais & Pires-Alves, 2004).

Os *Molecular Beacons* são oligonucleotídeos usados como sonda de fita simples que forma uma estrutura secundária entre as extremidades 5'→3', chamada de *loop*. Este contém uma sequência que é complementar à sequência alvo, sendo que o seu princípio é o mesmo da sonda *TaqMan* (Novais & Pires-Alves, 2004).



O dois métodos de análise experimental mais comumente utilizados na RT-qPCR são a quantificação absoluta e relativa. A absoluta determina a contribuição do número de cópias do gene, geralmente por relacionar o sinal de PCR obtido com uma curva padrão. Já as quantificações relativas relacionam o sinal do transcrito do alvo em um determinado tratamento em relação a uma condição controle. O método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  é uma forma indicada de se analisar mudanças relativas na expressão gênica (Livak & Schmittgen, 2001). Contudo, esta metodologia permite que os cálculos sejam feitos com a utilização de somente um gene normalizador.

Há diversas variáveis que precisam ser controladas em análises de expressão, como quantidade de material inicial, eficiência enzimática, diferenças entre tecidos ou células na atividade transcricional (Vandesompele *et al.*, 2002), integridade e quantidade de RNA, tratamento experimental e variações entre amostras (Wong & Medrano, 2005). Os resultados obtidos através de RT-qPCR devem ser normalizados com um gene controle interno, cuja expressão não pode variar independente do tratamento experimental aplicado (Schmittgen & Zakrajsek, 2000). Entretanto, a validação destes genes de referência para diferentes plantas e em condições específicas não tem sido muito estudada (Gutierrez *et al.*, 2008). Embora Czechowski e colaboradores (2005) tenham sugerido uma série de genes candidatos a controle internos diferentes dos que normalmente são utilizados, citações recentes indicam que a importância destes resultados não foi reconhecida. De fato, nos últimos dois anos genes normalizadores putativos ainda continuam sendo utilizados para PCR em tempo real em plantas mesmo não sendo a melhor opção (Gutierrez *et al.*, 2008). Estudos mostram que a expressão de diversos genes controle, embora constantes em algumas condições experimentais, pode variar consideravelmente com outros tipos de tratamentos (Volkov *et al.*, 2003; Czechowski *et al.*, 2005; Nicot *et al.*, 2005), o que pode levar a interpretações biológicas equivocadas.

A validação de genes normalizadores adequados pode ser feita através da avaliação de dados obtidos a partir de RT-qPCR com algoritmos estatísticos como geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) e Normfinder (Andersen *et al.*, 2004). Pérez *et al.* (2008) analisaram a estabilidade de dez genes de referência através da utilização destes três softwares e os resultados obtidos se mostraram semelhantes.

Desta forma, fica evidente que cada experimento possui suas particularidades e a obtenção de dados e análise de resultados devem ser avaliados com minúcia para evitar

interpretações errôneas. Os genes normalizadores a serem utilizados devem ser selecionados com base no experimento em questão e não baseados em referências de outros estudos assim como o método de análise, uma vez que a acurácia dos resultados obtidos são dependentes da escolha adequada do gene “housekeeping” que será utilizado para comparações relativas de expressão.

### **3. Hipótese do Trabalho**

A resistência da tangerina Poncan (*C. reticulata* Blanco) e a suscetibilidade de laranja doce (*C. sinensis* L. Osb.) à clorose variegada do citros pode ser comparada através da avaliação da expressão diferencial de genes durante o processo de infecção.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar a expressão diferencial de genes em laranja Pera e tangerina Poncan nos estágios iniciais de infecção por *X. fastidiosa*.

#### **4.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a expressão de genes candidatos identificados em bibliotecas de ESTs (CitEST) nos estágios iniciais de infecção por *X. fastidiosa*.
- Avaliar a expressão diferencial de genes de bibliotecas subtrativas supressivas durante os estágios iniciais de infecção por *X. fastidiosa* em plantas suscetíveis e resistentes.
- Avaliar o transcriptoma enriquecido de tecido de xilema de tangerina Poncan inoculada com *X. fastidiosa*.
- Avaliar expressão de genes candidatos por RT-qPCR (real time quantitative PCR) em resposta à infecção.

### **5. Material e Métodos**

## 5.1. Ensaios biológicos

Os experimentos foram conduzidos com plantas fisiologicamente adultas de laranja Pera e de tangerina Poncan enxertadas sobre limão Cravo e mantidas em ambiente protegido. Foram produzidas trinta mudas de laranja e cinquenta de tangerina com material livre de vírus ou outros patógenos originados do Programa de Plantas Básicas e Matrizes do Centro de Citricultura Sylvio Moreira do IAC. A irrigação das plantas foi feita por gotejamento, permitindo dispensar volumes moderados e homogêneos de água (cerca de 200 ml/planta/dia) em seus vasos, proporcionando uniformidade quanto à disponibilidade de água as plantas.

Para o experimento de inoculação foram selecionadas as plantas que apresentaram tamanho uniforme e emissão de folhas jovens. Quando as brotações atingiram o comprimento aproximado de 10 cm, todas conduzidas em haste única, estas foram utilizadas para o desafio com a bactéria. Para isso, a estirpe 9a5c de *X. fastidiosa* foi isolada de planta de laranja Pera com sintomas de CVC e cultivada *in vitro* a 28°C, por 10 dias, em placa de Petri com meio de cultura PW agar (Davis *et al.*, 1978). Após esse período de crescimento as colônias da bactéria foram retiradas do meio de cultura, suspensas em água destilada e removidas de restos do meio de cultura por centrifugação (3.000 xg/5 min). O precipitado resultante foi lavado duas vezes em tampão PBS estéril (100 mM fosfato sódio; NaCl 0,85%) e suspenso no mesmo tampão. Para a inoculação, 10 µl da suspensão bacteriana ( $7 \times 10^7$ ), ou tampão PBS nas plantas controles, foram depositados sobre a haste principal da muda em três pontos distintos e realizadas cinco perfurações com agulha sobre a gota da suspensão segundo adaptação do método utilizado por Hopkins (1985).

Com o intuito de obter uma maior eficiência de penetração bacteriana no interior do caule, as plantas foram submetidas a estresse hídrico dois dias antes da inoculação, o que resultou em rápida e completa absorção da suspensão bacteriana. A região do caule inoculada com a bactéria foi marcada e somente as folhas emitidas acima deste ponto foram utilizadas nos experimentos de construção das bibliotecas para SSHs e RNA-seq de laranja e tangerina. Para a análise de transcriptoma de tangerina foram coletados os tecidos xilemáticos acima do ponto de inoculação.

A população da bactéria nas plantas experimentais foi monitorada por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) (viabilidade) (Coletta Filho *et al.*, 2007) e por

PCR em tempo real para quantificação (RT-qPCR) (Oliveira *et al.*, 2002). Para a determinação da UFC foi utilizado o pecíolo e a nervura central de cada amostra foliar que foram coletadas e pesadas (100 mg de tecido). A viabilidade bacteriana somente foi avaliada em tecidos após 21 dias da inoculação com três repetições biológicas. Tempos menores não foram avaliados devido ao difícil isolamento dessa bactéria em meio de cultura quando em baixa população. O procedimento de isolamento bacteriano foi realizado em câmara asséptica de fluxo laminar onde o material foi esterilizado superficialmente (2 min em álcool 70%, hipoclorito de sódio 2% e água destilada estéril). Após a desinfecção superficial as amostras foram cortadas em pequenas secções em tubos Eppendorff com 1 mL de tampão PBS autoclavado, maceradas e homogeneizadas dentro do próprio tubo com o auxílio de uma pinça. Com a suspensão homogeneizada foi feita diluição serial (1:1 a 1:10.000). Após a diluição, duas alíquotas de 100 µL de cada amostra foram plaqueadas em meio de cultura sólido PW agar, acondicionadas em estufa tipo BOD à temperatura de 28°C, e avaliadas sob microscópio estereoscópio 14 dias após o plaqueamento para o número médio de unidades formadoras de colônia (CFU).

Para a quantificação, ou detecção no caso do tecido xilemático das tangerinas, da população bacteriana nos tecidos inoculados foi extraído o DNA genômico total (planta + bactéria) após 1, 7, 14 e 21 dias da inoculação através do método de CTAB a partir de 100 mg de tecido vegetal (Murray & Thompson 1980). A qualidade do DNA obtido das amostras foi visualizada em eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo etídio (0,5 ng/ml) sob luz ultravioleta.

A concentração desses DNAs foi determinada por espectrometria no espectrofotômetro *Nanodop 8000* (Uniscience). Esses foram utilizados no monitoramento da quantidade de bactéria nos tecidos por PCR em tempo real no aparelho ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). A reação de amplificação foi realizada num volume de 25 µL contendo 12,5 µL TaqMam PCR Master Mix fast (Applied Biosystems), 525 nM dos *primers* CVC-1 e CCSM-1 descritos por Oliveira *et al.*, (2002), e 200 ng do DNA de amostra. Em cada corrida experimental sempre foram utilizados os controles negativo (sem o DNA da bactéria) e positivo (DNA genômico da laranja Pera com a bactéria). Todas as amostras foram testadas em triplicatas dentro de cada corrida experimental.

As condições de amplificação utilizadas foram: um período inicial de incubação a 50°C por 2 min (digestão da uracil-N-glycosylase [UNG], para prevenir produtos PCR), seguido por 10 min a 95°C (ativação da AmpliTaq Gold DNA polimerase e desnaturação da UNG e do DNA matrix), e então 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. A amplificação e a captura do sinal foram realizadas no ABI PRISM 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). Os dados foram analisados utilizando o Sequence Detector Software 1.6, como descrito pelo fabricante.

A quantificação da bactéria foi comparada a uma curva padrão previamente otimizada e validada a eficiência de amplificação, segundo Oliveira *et al.* (2002). Esta foi feita utilizando concentrações conhecidas de DNA genômico da *X. fastidiosa* obtidas a partir da amplificação de diluições seriadas (10X) de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^8$  ng/ $\mu$ l. Os valores médios do Ct (Ciclo onde o gráfico do andamento da reação cruza o limiar de detecção [Threshold]) para cada diluição de DNA molde (eixo y) foram plotados contra o log<sub>10</sub> da quantidade inicial de DNA molde (eixo-x) para cada corrida. Todos os resultados reportados de RT-qPCR foram baseados no número de células de *X. fastidiosa* em cada amostra, que foi estimada a partir da curva padrão. Controles negativos (nenhum modelo de DNA) e positivos (DNA de *X. fastidiosa*) foram incluídos em todos os experimentos para excluir ou detectar uma eventual contaminação.

A partir do estabelecimento da curva padrão, a quantificação bacteriana nos tecidos foi realizada por RT-qPCR após 1, 7, 14 e 21 dias da inoculação, com três repetições biológicas, em ambas as espécies de citros. A estimativa da quantidade relativa de *X. fastidiosa* nos tecidos foi determinada pela divisão da quantidade do alvo pelo calibrador (curva padrão). Em todas as corridas realizadas a curva padrão foi incluída.

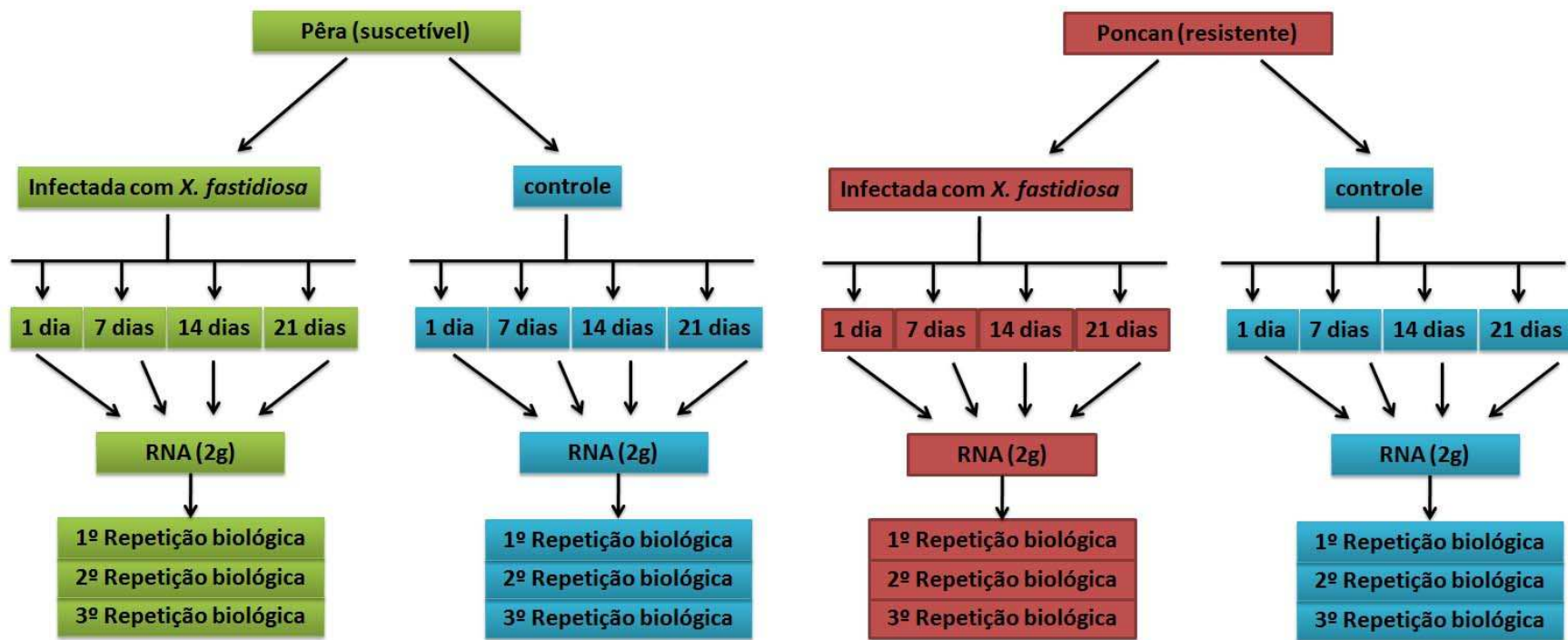
No caso dos tecidos xilemáticos de tangerina foi verificada a presença ou ausência da bactéria dos tecidos após um dia da inoculação. As amostras foram consideradas positivas para a presença da *X. fastidiosa* quando apresentaram Ct (Cycle Threshold) inferior ou igual a 37, visto que, amostras negativas não apresentam amplificação após esse Ct (dados não publicados).

## **5.2. Bibliotecas subtrativas supressivas (SSH)**

O mesmo material vegetal coletado para o experimento de monitoramento da população de *X. fastidiosa* foi utilizado para a realização a construção das bibliotecas para SSHs. Esse material, após coletado, foi imediatamente armazenado em nitrogênio líquido, para evitar degradação do RNA.

O RNA total foi extraído com Trizol (Invitrogen Life Technologies) conforme instruções do fabricante a partir de 2 g de material vegetal. Cada amostra era formada por um *pool* de folhas para cada genótipo infectado ou não nos diferentes tempos após inoculação. Foram extraídas três repetições biológicas para cada genótipo infectado e seus respectivos controles (não infectados) totalizando doze amostras distintas (Figura 5). Os RNAs foram avaliados quanto a sua qualidade e integridade em “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

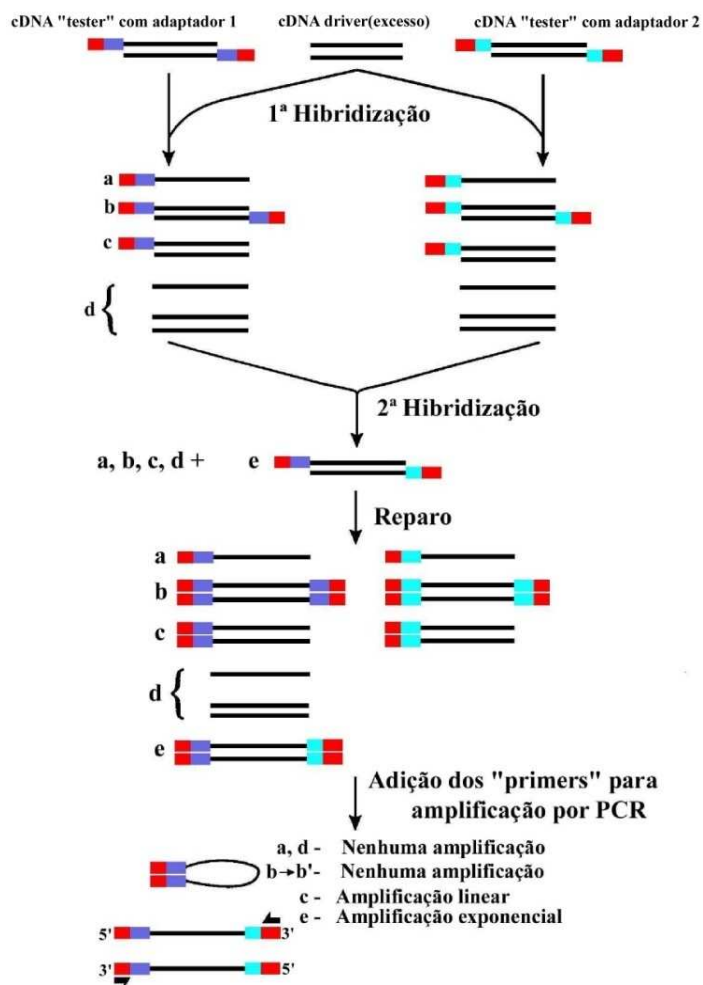
Os mRNAs das diferentes populações de RNA total foram purificados independentemente. Para isso, os RNA poli A+ foram isolados de aproximadamente 1 mg de RNA total usando o polyATtract mRNA Isolation System (Promega), conforme instruções contidas no Kit.



**Figura 5.** Esquema geral das amostras utilizadas na construção das bibliotecas subtrativas supressivas (SSH). As bibliotecas foram construídas utilizando um *pool* constituído de material vegetal coletado em diferentes tempos após inoculação com *X. fastidiosa* (1, 7, 14 e 21 dias) e plantas não infectadas (controle) com três repetições biológicas para cada condição.

Para a elaboração das seis bibliotecas SSHs foram utilizados os *pools* dos RNAs provenientes das 1º, 2º e 3º repetições biológicas com laranja Pera e tangerina Poncan.

As bibliotecas foram preparadas usando o PCR – Select™ cDNA Subtraction Kit – (Clontech) conforme esquematizado na Figura 6. Como *tester* considerou-se as amostras das quais selecionaram-se os cDNAs diferencialmente expressos (laranja Pera ou tangerina Poncan infectadas com *X. fastidiosa*) e como *driver* considerou-se as amostras objetos da comparação (laranja Pera e tangerina Poncan não inoculadas), com o objetivo de eliminar as seqüências não diferenciais através do processo subtrativo.



**Figura 6.** Diagrama para a hibridização subtrativa, baseado no manual da Clontech (PCR – Select™ cDNA Subtraction Kit).



Com o intuito de melhorar a etapa de clonagem, a concentração do cDNA utilizada nas reações 1 e 2, realizadas conforme especificações da Clontech, foi aumentada em 10X. Os fragmentos de DNA gerados a partir das bibliotecas foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%. Os fragmentos menores que 650 pb foram descartados, e os demais foram cortados do gel de agarose para a realização do seqüenciamento.

Os *amplicons* extraídos do gel de agarose foram purificados utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare). Depois de purificados, os fragmentos foram ligados no vetor pJET (Fermentas) segundo instruções do fabricante. As construções foram então transformadas em *E. coli* DH5 $\alpha$  incubando-se as células em gelo por 30 min com as reações da ligação. Em seguida, transferiu-se a suspensão de células para banho seco a 42°C por 1 min e 15s e novamente incubadas em gelo por 3 min. Após essas etapas, foram adicionados 800  $\mu$ L de meio SOC (10 g de bactotripton, 5 g de extrato de levedura, 0,585 g de NaCl, 186 mg de KCL, 10 mL de glicose 2M, 1 L de água filtrada qsp). As culturas foram incubadas a 37°C por 1 h e 15 min, sob agitação (aproximadamente 250 rpm). As células foram plaqueadas em meio LB (10 g de tripton, 10 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl) contendo ampicilina (100  $\mu$ g/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 16 h. Os clones recombinantes foram transferidos para 160  $\mu$ L de meio “CircleGrow” (Bio 101) (40 g/L), glicerol 15% e ampicilina (100  $\mu$ g/mL), a 37°C por 22 h. Foram feitas minipreparações de DNA plasmidial e realizadas as reações de acordo com as instruções da Applied Biosystems. O seqüenciamento foi realizado em um ABI 3730 Analyser. Os cromatogramas gerados foram submetidos à análise de qualidade (PhredPhrap > 20), retirada de vetor, adaptadores e montagem pelo Phred/Phrap/Consed (Gordon et al., 1998). As seqüências geradas foram analisadas e comparadas por buscas de similaridade com seqüências de proteínas disponíveis no GeneBank utilizando a ferramenta BLASTX.

### **5.3. Transcriptoma por RNA-seq**

Inicialmente foi proposto no presente trabalho caracterizar e comparar quatro perfis (1, 7, 14 e 21 dias infectados com *X. fastidiosa*) de expressão gênica global de laranja Pera e tangerina Poncan através da construção de SSHs. No entanto, devido ao insucesso dessa metodologia foi necessária a alteração da técnica para as análises de

expressão gênica. Nós optamos pela técnica de RNA-seq que permite analisar transcriptomas complexos, independente de conhecimento prévio do genoma. Além disso, possui uma faixa de detecção muito maior quando comparada a técnica de microarranjo de DNA (9.000 vezes *versus* ~100 vezes) (Marioni *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Devido à grande quantidade de informações obtidas a partir da técnica de seqüenciamento de nova geração e os custos envolvidos, foi decidido avaliar a expressão global por RNA-seq de somente um tratamento após a infecção, sendo que demais tratamentos foram avaliados pela expressão específica de genes selecionados através de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

### 5.3.1. Experimento Piloto

Para a seleção de qual seria o tratamento mais relevante para observar a resposta inicial à infecção por RNA-seq, foi realizado um experimento piloto com quatro tratamentos (tempos após infecção) em plantas de tangerina Poncan utilizando-se genes previamente avaliados no transcriptoma de citros (CitEST). Foram selecionados alguns genes que apresentaram indução em plantas de tangerina Poncan após 30 dias do desafio com *X. fastidiosa*. Dentre eles estão o *CC-NBS-LRR*, que percebe sinal molecular da bactéria e desencadeia a cascata de sinalização; *pad4* envolvido na síntese do ácido salicílico (AS), *pr1* que é uma proteína-PR, o *npr1*, que é requerido na transdução de sinal de AS, e por fim, o gene *apetala* envolvido na via de sinalização do etileno, uma das respostas mais tardia da planta à infecção (De Souza *et al.*, 2007b) (Tabela 1).

**Tabela 1:** ORFs do CitEST com potencial para avaliação da expressão diferencial.

ORF	Função Putativa
<i>CC-NBS-LRR</i> type disease resistance protein	Resistência a fitopatógenos
<i>apetala2</i> /ethylene responsive factor	Sinalização celular
<i>pad4</i>	Envolvido na via do AS
<i>npr1</i>	Indutor de proteínas PR
<i>pr1</i>	Proteína relacionada à patogênese

O RNA total foi extraído com Trizol (Invitrogen Life Technologies) e tratado com DNase RNase Set-Free (Qiagen), formando um conjunto de três repetições biológicas de tangerina Poncan para cada tratamento, infectado ou não.

Para síntese de cDNA foram utilizados 500 ng/μl de RNA total e a reação efetuada conforme instruções do fabricante (Fermentas). Esses cDNAs foram utilizados em triplicatas na seguinte reação: 2μl de cDNA diluído (1:25); 1,5μM de cada *primer* (direto e reverso) e 12,5 μL do “SYBR green PCR master mix” (Applied Biosystems), o volume final foi ajustado para 25 μL com água Milli-Q. As reações foram incubadas a 50°C por 2 min, 10 min a 95°C e 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C. As amplificações foram conduzidas no ABI PRISM 7500 Fast SDS versão 1.4 (Applied Biosystem).

A detecção dos produtos de PCR foi medida por monitoramento do aumento da fluorescência emitida pelo marcador *SYBR green* que está intercalado na fita dupla de DNA. O gene que codifica para β-tubulina foi utilizado como controle endógeno (CE) para normalizar as amostras das possíveis diferenças de concentrações de cDNAs. Os resultados foram normalizados usando o valor do Ct obtido do CE. Este é um valor numérico designado para cada corrida, onde o nível de fluorescência da reação é detectada durante a fase exponencial. Para a normalização foi utilizada a equação  $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{controle endógeno})$ . O aumento dos níveis de expressão do gene alvo para cada condição foi calculado através da equação:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$ . O calibrador é o valor obtido para uma amostra específica. O aumento nos níveis de expressão é sempre obtido em relação ao calibrador específico utilizado. Neste caso, foi utilizado o valor obtido da planta não inoculada com o patógeno. A quantificação foi obtida por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001). As médias das três repetições biológicas de cada amostra com os diferentes genes analisados foram comparadas aplicando o teste *t* ( $P \leq 0.05$ ).

Para todas as amplificações feitas no RT-qPCR foi realizada uma curva de dissociação para a verificação de amplificações inespecíficas decorrentes de possíveis contaminações.

### 5.3.2. RNAseq de laranja Pera e tangerina Poncan.

A partir do perfil de expressão escolhido foi iniciado o preparo das amostras que foram enviadas para empresa Macrogen (Coréia do Sul), para sequenciamento utilizando a plataforma *Genome Analyzer IIx* (Illumina). O material vegetal utilizado foi o mesmo usado em todos os experimentos desse trabalho.

O RNA total foi extraído e tratado como descrito no experimento piloto. Foram extraídas amostras de RNA de três repetições biológicas independentes para cada genótipo (laranja Pera e tangerina Poncan) infectado após um dia e seus respectivos controles (não infectados) de folhas e também do tecido xilemático das plantas de Poncan. Os RNAs foram avaliados quanto a sua qualidade e integridade em “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). As amostras de RNA também foram quantificadas no *spectrophotometer nanodrop 8000* (Uniscience) e armazenados a uma temperatura de -80°C.

Após essas verificações foram enviados à empresa 10 µg dos RNAs totais. Assim que as amostras foram recebidas pela empresa, passaram pelo equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent) para a verificação da qualidade novamente.

O sequenciamento da laranja Pera e tangerina Poncan (tecido foliar) ainda está em andamento. Portanto, não houve tempo hábil para incluir esses resultados nessa etapa. Portanto, a análise se concentrou nos resultados de tecidos xilemático, sadio e infectado, de tangerina Poncan.

Os resultados de RNA-seq foram enviados no formato fasta, bem como os arquivos de qualidade similar ao Phred  $\geq 20$  (Ewing *et al.*, 1998). Essas sequências foram mapeadas contra o genoma referência de *Citros clementina* utilizando o programa TopHat, o qual pode alinhar fragmentos de *splicing* (Trapnell *et al.*, 2009). Após o alinhamento, as sequências codantes foram usadas para medir a abundância relativa através do programa Cufflink, o qual mede a abundância da transcrição em fragmentos por kilobase de exon por milhão de fragmentos mapeados (FPKM) (Trapnell *et al.*, 2010). A quantificação dos transcritos foi usada para calcular o nível de expressão diferencial entre tangerina Poncan inoculada com a bactéria e não inoculada (controle) e suas significâncias no Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2010). Os transcritos diferencialmente expressos foram anotados e categorizados automaticamente no GO (Gene Ontology).

#### **5.4. Análise da expressão dos genes candidatos por RT-qPCR**

Alguns genes induzidos e reprimidos, identificados a partir das análises do transcriptoma de tangerina Poncan, foram selecionados para avaliação em *time course* através do RT-qPCR (Tabela 2). Outro gene avaliado foi o Aux/IAA obtido na primeira montagem, o qual não usou genoma de referência (dados não mostrados) (Tabela 2). Além desses, foram analisados alguns genes relacionados às vias do SA, JA e ET com o intuito de identificar o modelo de resposta de citros em resposta a *X. fastidiosa* nos estágios iniciais da infecção. Os genes avaliados foram: *pad4*, *npr1*, *pr-1* e *CC-NBS-LRR* que estão envolvidos na via do SA; *LOX*, *PDF1.2*, *apetala2* e *JAZ1*, envolvidos nas vias do JA/ET. As sequências desses genes foram obtidos no banco de dados do CitEST e utilizadas para o desenho dos *primers* segundo Stuart (2011). Nessa análise foi verificada a expressão de dois genes *AP2* (*apetala2*/ethylene responsive factor). Um deles foi identificado no CitEST e o outro no transcriptoma da Poncan. Esses genes pertencem a uma mesma família, porém trata-se de dois genes diferentes. Adicionalmente, também foi avaliada a expressão de dois *NBS-LRR*, onde um foi identificado no CitEST e o outro nas análises do transcriptoma da tangerina Poncan e também são dois genes diferentes. A diferença entre os genes foi verificada através da ferramenta Blast/Global Alignment (Needleman-Wunsch alignment of two sequences) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Os *primers* para esses genes foram desenhados utilizando o programa 'PrimerExpress' (Applied Biosystems). Além da utilização de um programa computacional, faz-se necessário obedecer a certas regras para o desenho dos *primers*, como tamanho (entre 20 e 25 pares de bases), temperatura de anelamento (entre 55°C e 60°C) e concentração de GC (superior a 50%).

A especificidade dos *primers* foi checada *in silico* contra o banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta *Primer-BLAST*. Adicionalmente, também foi verificado o padrão de dissociação obtido após RT-qPCR, onde para cada par de *primer* foi feita uma curva de dissociação. Esta consiste no aumento gradativo da temperatura após PCR. Cada *amplicon* tem uma específica temperatura de *melting* devido à composição de nucleotídeos do *amplicon*, o que permite que a dupla fita se desnature. Quando é atingida a temperatura de *melting* a dupla fita se abre e a intensidade do *SYBR Green* diminui drasticamente. Isto é visualizado de forma gráfica, através de um pico se houver apenas um *amplicon*, ou dois ou mais picos se houverem ampliações inespecíficas. As ampliações inespecíficas

significam que ou o *primer* está anelando em outras regiões do DNA que não o gene alvo, ou que há contaminação na amostra.

A eficiência dos *primers* foi estimada em cada experimento através do software Miner (<http://www.miner.ewindup.info/>). Este software quantifica os resultados do RT-qPCR com base na cinética da amplificação por PCR individualmente para cada amostra, sem a necessidade de uma curva padrão e independente de qualquer julgamento subjetivo, permitindo o cálculo direto de eficiência e dos valores do ciclo de quantificação (Cq) (Artico *et al.*, 2010).

**Tabela 2.** Genes selecionados a partir do transcriptoma de tangerina Poncan para avaliação em *time course* através do RT-qPCR.

Gene	<sup>a</sup> id_Montagem	<sup>b</sup> id_Citrus clementine
<b>Genes Reprimidos</b>		
<i>expansina</i>	NGS-CR-1148146	clementine0.9_019191m^tPACid:19261197
<i>CLV1-LRR</i>	NGS-CR-1164791	clementine0.9_001457m^tPACid:19269785
<b>Genes Induzidos</b>		
<i>NBS-LRR</i>	NGS-CR-1245087	clementine0.9_035360m PACid:19269609
<i>LRR-RLK</i>	NGS-CR-1255018	clementine0.9_002663m PACid:19254796
<i>CBAP12</i>	NGS-CR-1226862	clementine0.9_034300m PACid:19263042
<i>RKIP</i>	NGS-CR-1247162	clementine0.9_023420m PACid:19285502
<i>AIP</i>	NGS-CR-1204364	clementine0.9_033951m PACid:19286816
<i>myo</i>	NGS-CR-1214948	clementine0.9_000283m PACid:19262035
<i>AP2</i>	NGS-CR-1208699	clementine0.9_014064m PACid:19262960
<i>Aux/IAA*</i>	nd	

<sup>a</sup> Identificação dos genes do transcriptoma de Poncan infectada com *X. fastidiosa*

<sup>b</sup> Identificação dos genes de *C. clementina* (Genoma de referência utilizado na montagem das bibliotecas do RNA-seq)

\*Gene obtido a partir da primeira montagem dos dados de RNA-seq (tangerina Poncan – xilema) sem utilização de genoma de referência

Para a seleção de quais seriam os melhores normalizadores para serem utilizados nos experimentos, alguns genes que sabidamente possuem expressão constitutiva foram selecionados. Os genes escolhidos para esta análise foram: *β-tubulina*, *ETEF2* (eukaryotic translation elongation factor 2), *ubiquitina*, *EGIDH* (NADP-isocitrate dehydrogenase) e *ciclofilina*. A *β-tubulina* é utilizada rotineiramente para normalizar dados de RT-qPCR. Os genes *ETEF2*, *ubiquitina*, *EGIDH* e *ciclofilina* foram escolhidos com base no trabalho de Boava *et al.* (2010), a partir de seqüências de genes homólogos em citros que foram recuperadas do banco de dados CitEST. Os genes selecionados a

partir do trabalho de Boava *et al* (2010) foram desenhados e validados pelos autores e cedidos para a realização do presente trabalho.

A avaliação do nível de expressão e estabilidade dos cinco genes candidatos foi realizada com amostras de cDNAs provenientes de laranja Pera e tangerina Poncan sadias e inoculadas com *X. fastidiosa* nos diferentes tratamentos (1, 7, 14 e 21 dias), com três repetições biológicas para cada condição. As análises foram realizadas por RT-qPCR utilizando *SYBR green*. As reações foram feitas conforme descrito acima. Os dados de fluorescência obtidos nas corridas do RT-qPCR foram exportados para o software Miner, que gerou as eficiências e Cqs para cada amostra avaliada. Esses valores foram utilizados no programa qBase, versão v 1.3.5 (Hellemans *et al.*, 2007) que emprega o modelo de quantificação relativa delta-CT para transformar o valor de expressão em valores relativos não-normalizados. Esses valores foram utilizados para os cálculos dos níveis de expressão através do algoritmo geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) que determina o fator de estabilidade do gene normalizador (M). Este é definido como média de variação aos pares ('pairwise variation') de um gene em particular comparado com todos os outros genes normalizadores candidatos. Com isso, um baixo valor de M indica uma alta estabilidade do gene normalizador. O algoritmo geNorm utilizado está incluso no software GenEx version 5.0.1.5.

Para a realização das análises de expressão gênica através do RT-qPCR em *time course* (1, 7, 14 e 21 dias) foram utilizados RNAs totais extraídos de folhas de laranja Pera e tangerina Poncan, com três repetições biológicas infectados ou não com *X. fastidiosa*, nos diferentes tempos. As amostras não infectadas foram utilizadas como calibradores para cada tempo correspondente. Também foram utilizados RNAs totais extraídos dos tecidos xilemáticos das tangerinas Poncan infectadas ou não (calibrador) após um dia com *X. fastidiosa*.

A extração dos RNAs totais foram feitas utilizando o *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) e tratados com DNase utilizando o sistema de coluna da Qiagen (Rnase-Free Dnase Set). A qualidade e integridade dos RNAs foram avaliados em "RNA Nano Labchips" no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). A síntese do cDNA foi realizada segundo instruções do manual do *MLV-reverse transcriptase Kit* com a utilização de *primers* randômicos (Fermentas), a partir de 1 µg do RNA total. Após síntese, os cDNAs foram diluídos em 1:25 e utilizados nas qRT-PCRs.

As reações foram feitas em triplicatas utilizando sempre controle sem cDNA para detectar possíveis contaminações. Cada reação foi realizada conforme descrito no

item 5.1.4.1 utilizando 2 µl dos cDNAs diluídos. As avaliações foram realizadas no ABI Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) usando análises de quantificação absoluta. A detecção dos produtos de PCR foi medida por monitoramento do aumento da fluorescência emitida pelo marcador *SYBR green*. Para todas as amplificações feitas no RT-qPCR foi realizada uma curva de dissociação através do aparelho ABI Prism 7500 para a verificação de amplificações inespecíficas decorrentes de possíveis contaminações.

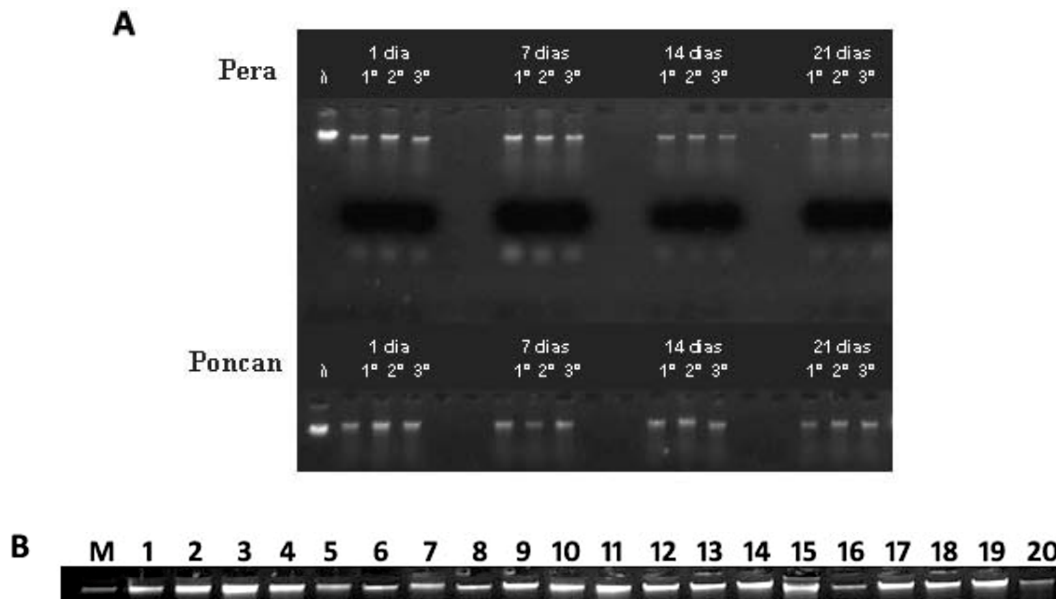
As análises e normalizações da expressão gênica foram realizados no software GenEx version 5.0.1.5 ([www.multid.se](http://www.multid.se)), utilizando as eficiências e Cqs gerados no Miner, e transformados em dados não normalizados (Q). Foram utilizados dois genes endógenos para a normalização dos dados. Esses genes foram selecionados a partir dos resultados obtidos no presente trabalho (item 6.4).

## **6. Resultados**

### **6.1. Monitoramento da população da bactéria**

Como resultado da viabilidade bacteriana nos tecidos de laranja Pera e tangerina Poncan, após 21 dias da inoculação, avaliada através de CFU, não foi observado o surgimento de colônias em nenhuma das diluições. Provavelmente a população da *X. fastidiosa* no xilema das plantas ainda estava muito baixa para permitir seu isolamento com eficiência (Dados não mostrados). Adicionalmente, após extração do DNA genômico total dos diferentes genótipos e tempos de inoculação, a qualidade do DNA obtido foi visualizada em eletroforese em gel de agarose (Figura 7A e B).

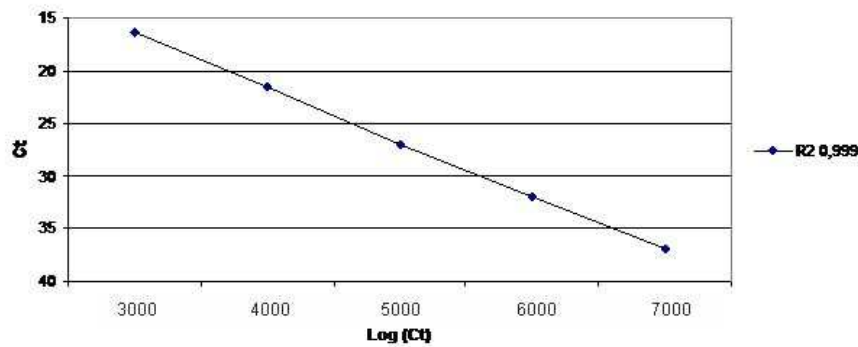




**Figura 7. A.** Verificação da qualidade do DNA em gel de agarose 0,8% das amostras de folhas laranja Pera e tangerina Poncan. Foram analisadas as três repetições biológicas de cada tempo (dias) após desafio com *X. fastidiosa*. **B.** Verificação da qualidade do DNA em gel de agarose 0,8% das amostras de tecidos xilemáticos de tangerina poncan: **amostras de 1 a 10** - dez repetições biológicas controles (inoculados com tampão PBS); **amostras de 11 a 20** - dez repetições biológicas que foram desafiadas com *X. fastidiosa*. **M** - padrão de concentração utilizado é DNA de  $\lambda$  50 ng.

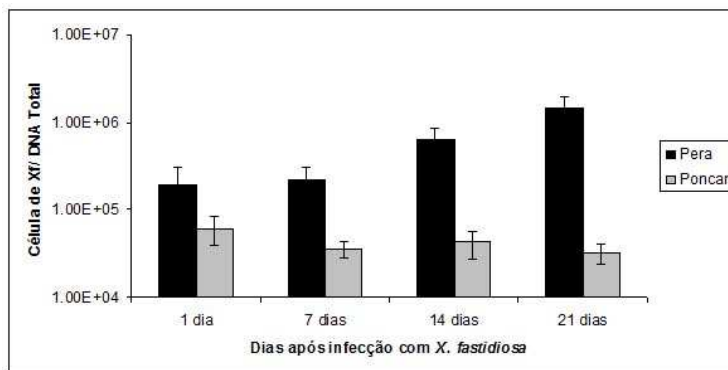
A concentração do DNA foi determinada no *spectrophotometer nanodop 8000* (Dados não mostrados). Após padronização da concentração, o DNA foi utilizado no monitoramento da bactéria nos tecidos por RT-qPCR.

Para as amostras provenientes dos tecidos foliares, a quantificação da bactéria foi comparada a uma curva padrão com DNA purificado da bactéria. Esta mostrou uma faixa linear com um coeficiente de correlação de 0.999 (Figura 8). Todos os resultados reportados de RT-qPCR foram baseados no número de células de *X. fastidiosa* em cada amostra, que foi estimada a partir da curva padrão. No caso dos tecidos xilemáticos de tangerina foi verificada a presença ou ausência da bactéria dos tecidos após um dia da inoculação.



**Figura 8.** Curva padrão determinada na RT-PCR utilizando cinco diluições conhecidas do DNA de *X. fastidiosa* diluídos com DNA total de laranja Pera infectada. A eficiência foi verificada através da relação linear entre o ciclo em que a fluorescência foi detectada (Ct) e o log da concentração dos DNAs diluídos.

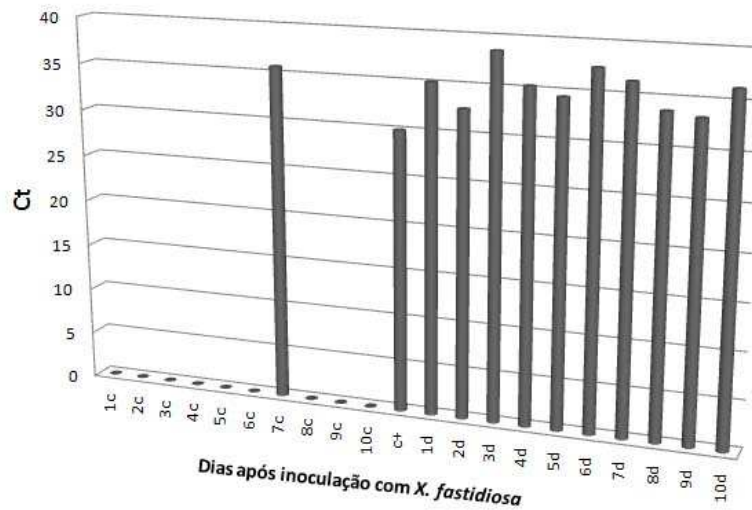
Após as análises por RT-qPCR foi verificado que nas plantas de laranja Pera infectadas com *X. fastidiosa* ocorreu um aumento gradativo da população ao longo do tempo, o que já era esperado devido à grande suscetibilidade dessa variedade de laranja doce à CVC (Figura 9). Contudo, a população da bactéria nas plantas de tangerina Poncan se manteve estável em todos os tempos avaliados (Figura 9).



**Figura 9.** Média da população de *X. fastidiosa* estimada pela técnica de RT-qPCR para as amostras foliares colhidas de laranja Pera e tangerina Poncan em vários dias após inoculação. Barras representam erros padrão das médias das três repetições biológicas.

Em relação às amostras dos tecidos xilemáticos de tangerina Poncan foi verificado que apenas um controle (7c) apresentou contaminação com a bactéria e, portanto foi descartado das análises. Além disso, uma amostra inoculada com o

patógeno não apresentou a presença da *X. fastidiosa* e também não foi utilizada nos experimentos de expressão gênica (Figura 10).

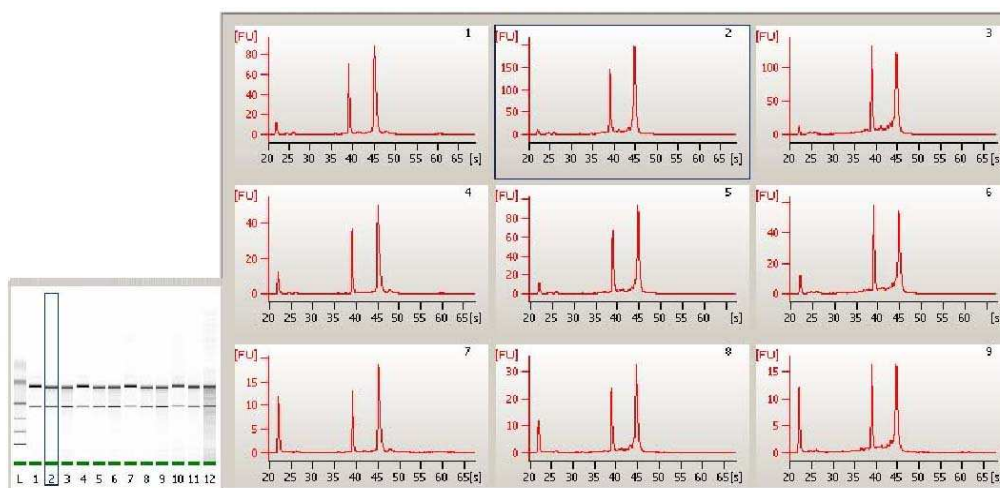


**Figura 10.** Detecção da *X. fastidiosa* no xilema de plantas de tangerina Poncan inoculadas ou não com a bactéria. (c) - são os controles. (d) - um dia após inoculação com a bactéria. (c+) - controle positivo de uma planta com CVC.

## 6.2. Bibliotecas subtrativas supressivas (SSH)

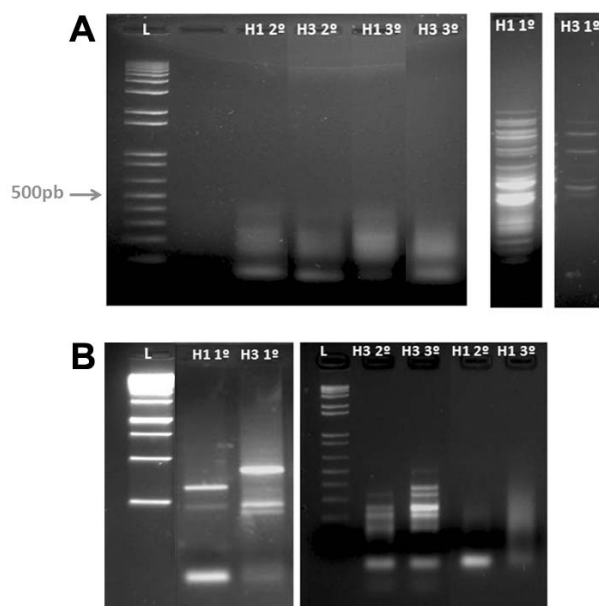
Foram construídas seis bibliotecas SSHs, sendo três provenientes de laranja Pera e três de tangerina Poncan.

Os RNAs utilizados nas realizações das SSHs foram avaliados quanto à qualidade e integridade no “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). (Figura 11).



**Figura 11.** A concentração e a integridade dos RNAs extraídos demonstradas através de gráficos, onde cada um é referente a uma amostra, e também representada em gel. **1-** RNA *pool* de Poncan controle 1º repetição biológica; **2-** RNA *pool* de Poncan infectada 1º repetição biológica; **3-** RNA *pool* de Poncan infectada 2º repetição biológica; **4-** RNA *pool* de Poncan infectada 3º repetição biológica; **5-** RNA *pool* de Pera controle 1º repetição biológica; **6-** RNA *pool* de Pera infectada 1º repetição biológica; **7-** RNA *pool* de Pera infectada 2º repetição biológica; **8-** RNA *pool* de Pera infectada 3º repetição biológica; **9-** RNA *pool* de Poncan controle 2º repetição biológica.

Os fragmentos de DNA gerados das bibliotecas foram cortados do gel de agarose 1,5% para a realização do sequenciamento. Os *amplicons* podem ser visualizados na figura 12A, gerados a partir da subtração de tangerina Poncan, e 12B, referente à amplificação de laranja Pera.



**Figura 12.** Gel de agarose 1,5% contendo os *amplicons* gerados após SSH de tangerina Poncan e laranja Pera das três repetições biológicas. **A.** **H1-** SSH onde o *Tester* é proveniente da tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa*; **H3-** SSH onde o *Tester* é proveniente da tangerina Poncan não infectada. **B.** **H1-** SSH onde o *Tester* é proveniente da laranja Pera infectada; **H3-**SSH onde o *Tester* é proveniente da laranja Pera sadia.

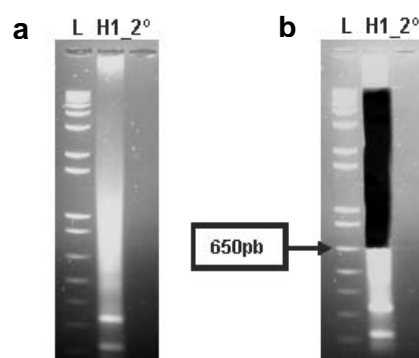
Os fragmentos purificados foram utilizados para clonagem e posterior transformação. Como resultado foi obtido uma taxa muito baixa de transformantes (Dados não mostrados). Após o sequenciamento foi verificado que mesmo utilizando *amplicons* acima de 650pb, os insertos clonados apresentaram tamanhos pequenos, aproximadamente 150pb. Isto implica na clonagem preferencial dos fragmentos menores devido à maior facilidade de ligação ao vetor de clonagem. Além disso, os poucos *contigs* montados apresentaram baixa qualidade contendo muito vetor, aproximadamente 90%, e nucleotídeos não identificados. Adicionalmente, após as análises de comparação por buscas de similaridade com seqüências de proteínas disponíveis no GeneBank não foram obtidas muitas sequencias similares às de plantas o que implicou no comprometimento das análises. Os resultados obtidos após o sequenciamento e análises das sequencias adquirida das SSHs de laranja Pera e tangerina Poncan infectadas com *X. fastidiosa* estão relacionados na Tabela 3.

**Tabela 3.** SSHs de laranja Pera e tangerina Poncan infectadas com *X. fastidiosa*. Resultados obtidos após sequenciamento e análise das sequencias por busca no GeneBank.

SSH	Quantidade de Clones	Contigs obtidos	Contigs sem similaridade	Contigs contaminantes	Contigs similares à plantas
Laranja Pêra infectada com <i>X. fastidiosa</i>	192	16	7	5	4
Tangerina Poncan infectada com <i>X. fastidiosa</i>	192	13	12	1	-

No esforço de solucionar esses problemas, novas clonagens foram realizadas. Primeiramente os testes foram realizados com H1 (tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa*) da 2º repetição biológica. Uma tentativa foi aumentar em 10 vezes a concentração de cDNA utilizada na amplificação da biblioteca. Os *amplicons* gerados foram cortados do gel de agarose 1,5% acima de 650 pb para obtenção de fragmentos maiores (Figura 13).

Contudo, o problema não foi solucionado, sendo os resultados semelhantes aos obtidos anteriormente (Dados não mostrados).



**Figura 13.** Gel de agarose 1,5% com os amplicons gerados após SSH de tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa* (segunda repetição biológica). **a.** L- ladder 1kb plus (Invitrogen); **H1 2º**- SSH onde o *Tester* é proveniente da tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa* (segunda repetição biológica). **b.** **H1 2º** - O mesmo gel da (a) mostrando *amplicons* já cortados com tamanho superior a 650pb.

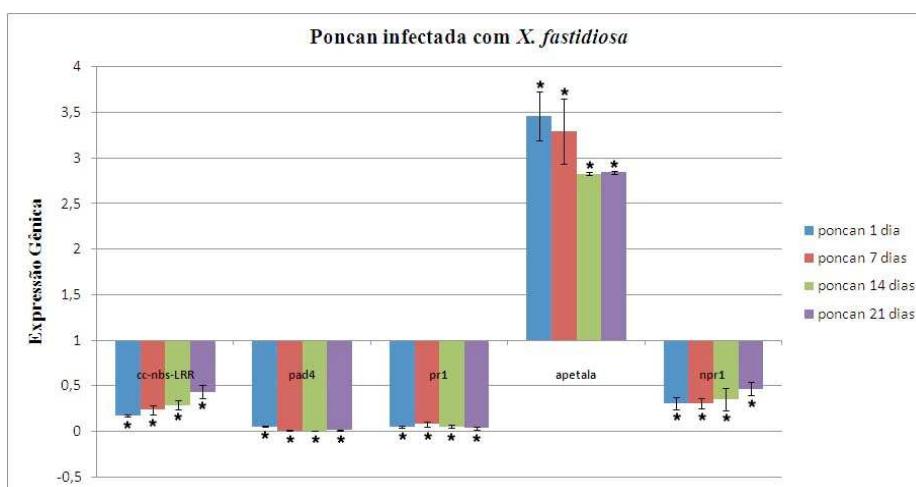
Em função do baixo rendimento das bibliotecas subtrativas supressivas e baixa perspectiva que essa técnica demonstrou em atender aos objetivos iniciais do projeto, optou-se por proceder às análises não mais com resultados das subtrações. A técnica escolhida foi a RNA-seq, a qual permite o mapeamento e quantificação de transcriptomas.

### 6.3. Transcriptoma de laranja Pera e tangerina Poncan por RNA-seq

Para a seleção do ponto de amostragem mais relevante para avaliação por RNA-seq, foi realizado um experimento piloto com os quatro tempos propostos, em plantas de tangerina Poncan através da expressão de genes previamente avaliados no CitEST.

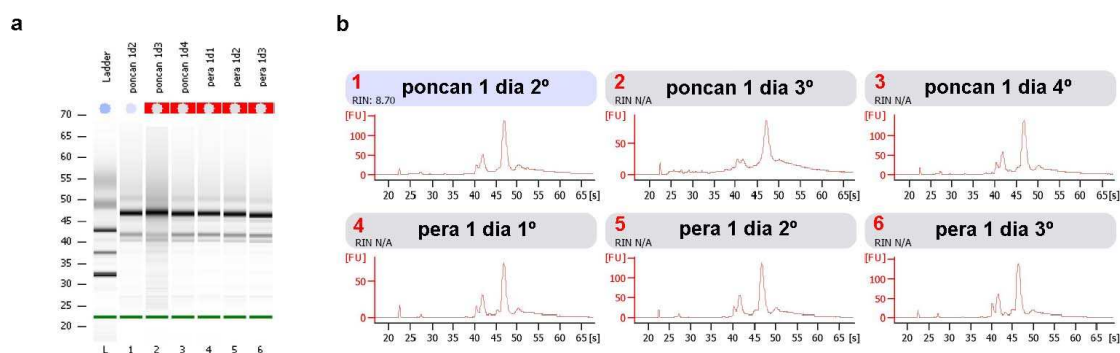
Após análises da expressão gênica por RT-qPCR observou-se que apenas o gene *apetala2* foi significativamente induzido em todos os tempos avaliados. Os demais genes foram reprimidos em todos os tempos figura 14.

Visto o objetivo do trabalho em avaliar a expressão gênica no início da infecção, foi escolhido o perfil de um dia após desafio com *X. fastidiosa* para as análises de RNA-seq.



**Figura 14.** Quantificação relativa dos genes possivelmente associados com a resistência de tangerina Poncan à infecção por *X. fastidiosa*, usando cDNAs constituído por três repetições biológicas para cada tempo a partir de plantas inoculadas com a bactéria ou não. Os valores representam o aumento na expressão gênica em comparação com os valores obtidos para o cDNA de plantas sem patógeno (calibrador). Os resultados são as médias das amostras testadas em triplicata em corridas diferentes. As barras indicam o desvio padrão entre as médias.

A partir do perfil de expressão determinado, foi iniciado o preparo das amostras que foram utilizadas para o sequenciamento de nova geração (Illumina). Após as extrações do RNA das três repetições biológicas para cada genótipo (laranja Pera e tangerina Poncan, folha e xilema) infectado após um dia e seus respectivos controles (não infectados), estes foram avaliados quanto a sua qualidade e integridade em “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Alguns exemplos dessa avaliação podem ser observados na Figura 15. As amostras de RNA também foram quantificadas no *spectrophotometer nanodop 8000* (Uniscience) e armazenados a uma temperatura de -80°C (dados não mostrados).



**Figura 15.** A concentração e a integridade dos RNAs foram avaliadas em “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) demonstrada através de gráficos, onde cada um é referente a uma amostra que também é representada em gel. **a.** Representação em gel. **b.** Representação gráfica. L - marcador de peso molecular; amostras 1 a 3 - Poncan infectada com *X. fastidiosa* 2°, 3° e 4° repetição biológica; amostras 4 a 6 - Pera infectada com a bactéria 1°, 2° e 3° repetição biológica.

O RNA foi enviado para a empresa Macrogen, a qual realizou o sequenciamento das amostras de tecido xilemático de tangerina Poncan. As amostras foliares de laranja Pera e tangerina Poncan ainda estão em fase de sequenciamento.

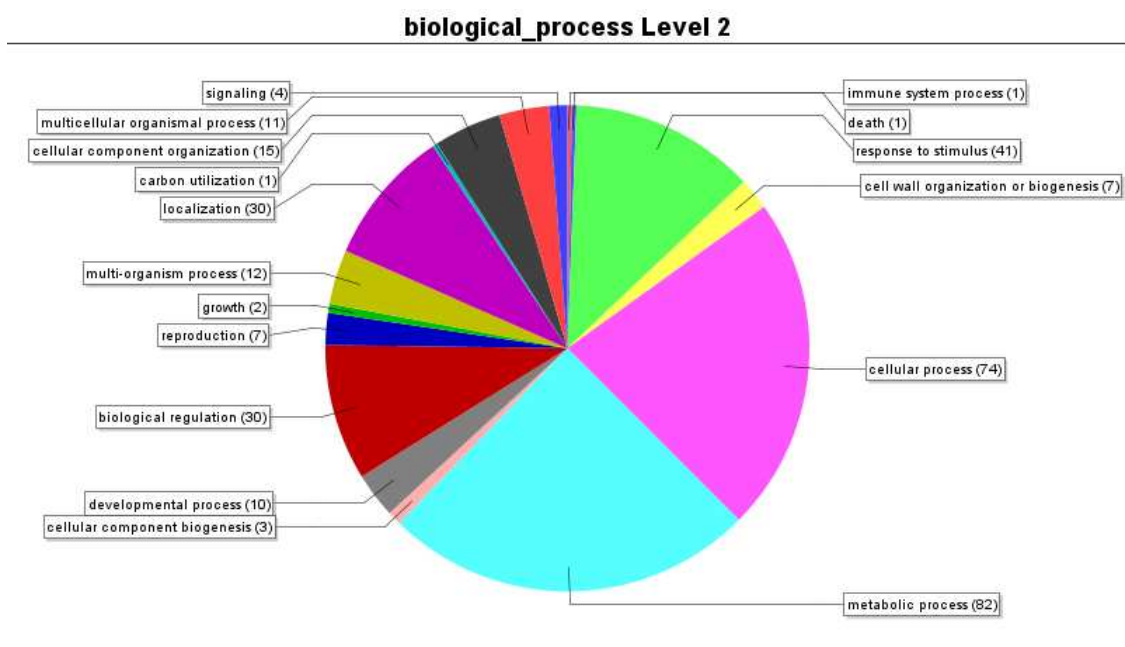
Como resultados do sequenciamento foram obtidos 37.326.339 sequencias da biblioteca infectada e 35.344.265 da biblioteca controle. Após análises no programa Cuffilink, 1.569 transcritos apresentaram variação significativa na expressão, onde 225 foram induzidos e 348 reprimidos, ambos com *fold*  $\geq$  1.0 (Tabela Anexo 1).

Após categorização dos transcritos com expressão significativa, de acordo com o GO, foi verificado que a maioria dos genes induzidos apresentou similaridade com proteínas que desempenham funções no metabolismo (82 transcritos). A segunda

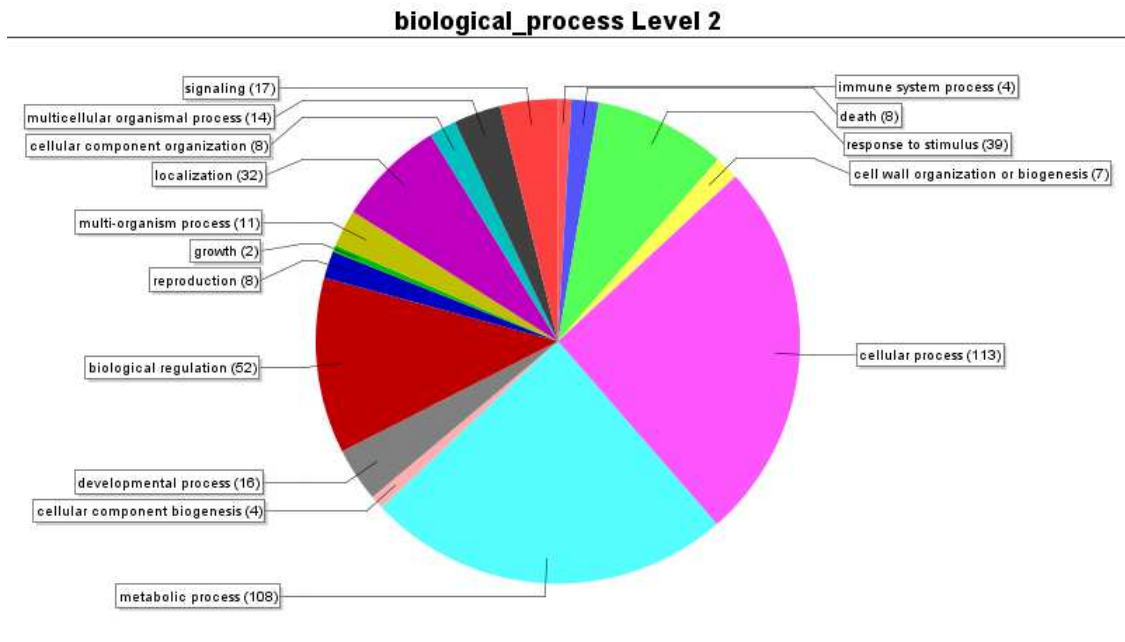


categoria mais representada foi a de processo celular, onde foram categorizados 74 genes. Adicionalmente, 41 transcritos possuem similaridade com proteínas que respondem a estímulos, dentre eles, um também está na categoria de processos do sistema imune, outros três genes que codificam para proteínas que atuam na sinalização, dentre outros que também possuem funções relacionadas a outras categorias (Figura 16).

As principais categorias funcionais dos genes reprimidos em plantas inoculadas com *X. fastidiosa* também foram associadas ao metabolismo (108 sequencias), processo celular (113 genes), resposta a estímulos (39 transcritos), sinalização (17 genes), regulação biológica (52 transcritos), entre outras (Figura 17).



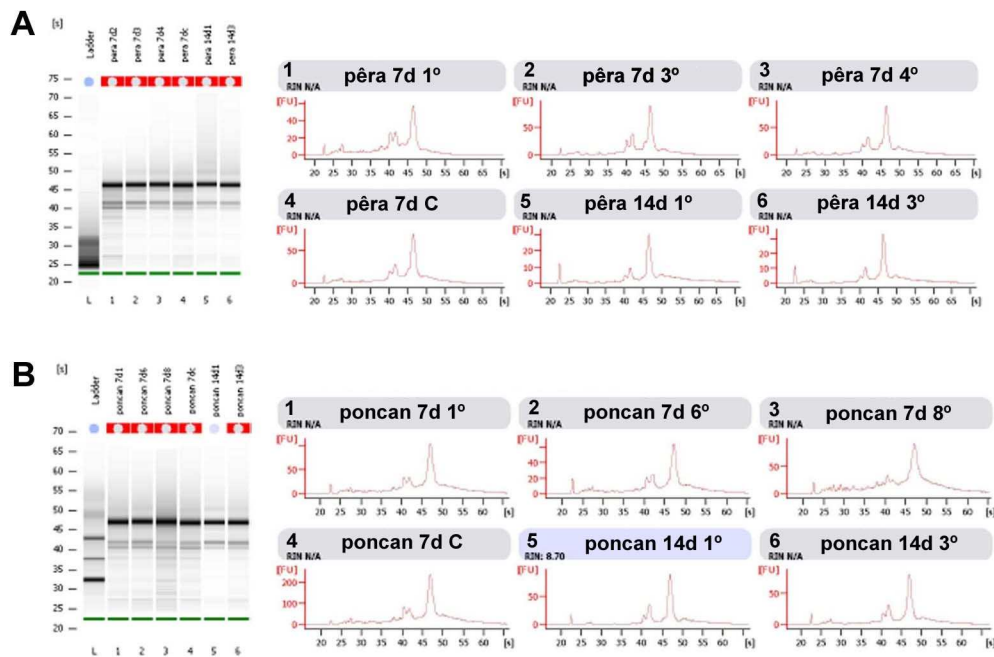
**Figura 16.** Categorização dos genes induzidos da biblioteca de tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa*. Os genes foram categorizados automaticamente de acordo com GO (Gene Ontology) e foram distribuídos conforme a função realizada nas células das plantas.



**Figura 17.** Categorização de genes reprimidos da biblioteca de tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa*. Os genes foram categorizados automaticamente de acordo com GO (Gene Ontology) e distribuídos conforme a função realizada nas células das plantas.

#### 6.4. Análise da expressão dos genes candidatos por RT-qPCR

Após a extração do RNA total das amostras de laranja Pera e tangerina Poncan (folha e xilema), a concentração e a integridade foram avaliadas utilizando “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Alguns exemplos de RNAs avaliados podem ser observados na figura 18. Os RNAs contaminados com DNA e/ou degradados foram descartados. As concentrações dos RNAs selecionados foram padronizadas em 1 µg/µl para síntese dos cDNAs.



**Figura 18.** Concentração e a integridade dos RNAs avaliadas em “RNA Nano Labchips” no aparelho Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) demonstrada através de gráficos, onde cada um é referente a uma amostra que também é representada em gel. **A.** RNAs provenientes de Pera infectada ou não com *X. fastidiosa*. **L** - marcador de peso molecular; **1 a 3** - RNA de laranja Pera infectada com *X. fastidiosa* após sete dias de inoculação; com três repetições biológicas; **4** - RNA de laranja Pera controle após 7dias de inoculação com tampão PBS; **5 e 6** - RNA de laranja Pera infectada com *X. fastidiosa* após 14dias de inoculação, com duas repetições biológicas. **B.** RNAs extraídos de tangerina Poncan infectada ou não com *X. fastidiosa*, nos diferentes tempos e com três repetições biológicas para cada tempo. **L** - marcador de peso molecular; **1 a 3** - RNA de tangerina Poncan infectada com a bactéria após 7dias de inoculação; com três repetições biológicas; **4** - RNA de Poncan controle após 7dias de inoculação com tampão PBS; **5 e 6** - RNA de tangerina Poncan infectada com *X. fastidiosa* após 14dias de inoculação, com duas repetições biológicas.

Os *primers* desenhados para os genes identificados no transcriptoma de tangerina Poncan, após as análises *in silico* contra o banco de dados do NCBI, apresentaram especificidade com as sequencias utilizadas para os desenhos (Dados não mostrados).

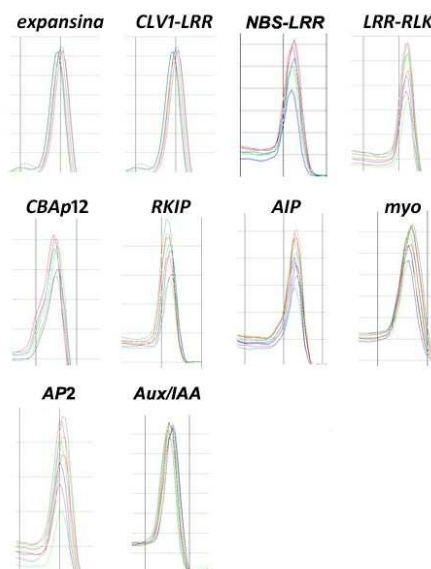
Adicionalmente, foi verificada a eficiência de amplificação para todos os *primers* através do software *Miner*. Como resultados todos apresentaram eficiências

aceitáveis, entre 90 - 100% (Tabela 4). A especificidade dos *primers* também foi verificada através do padrão de dissociação obtido no RT-qPCR. A curva de dissociação apresentou um único pico para todos os genes avaliados confirmando a existência de apenas um *amplicon* (Figura 19).

Esses resultados demonstraram que o valor de expressão gênica de todos os genes avaliados foi realmente devido às suas expressões na presença de *X. fastidiosa*, e não devido a artefatos provenientes de ampliações inespecíficas ou contaminações.

**Tabela 4.** Temperatura de anelamento e eficiência de amplificação dos *primers* obtida através do *software Miner*.

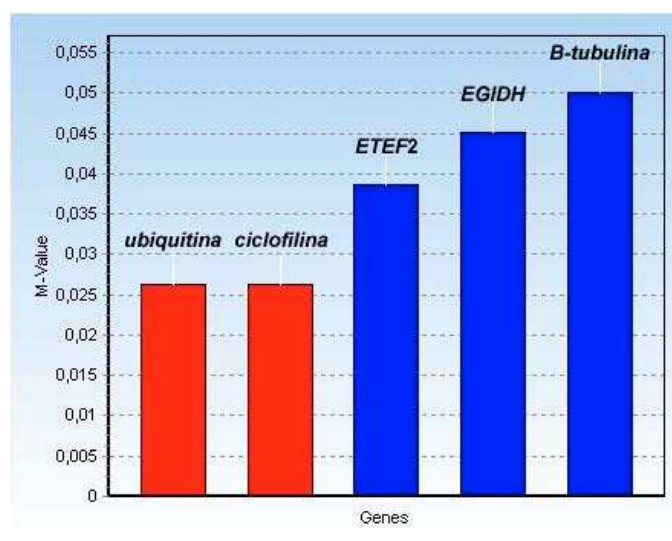
Gene	Tamanho F (pb)	F -Tm C <sup>o</sup>	Tamanho R (pb)	R -Tm C <sup>o</sup>	eficiência (%)
<i>expansina</i>	18	58	19	59	0,98
<i>CLV1-LRR</i>	21	60	16	59	1,01
<i>NBS-LRR</i>	20	58	21	58	1,00
<i>LRR-RLK</i>	23	60	22	58	0,99
<i>CBAp12</i>	19	58	20	60	1,02
<i>RKIP</i>	16	58	21	59	1,01
<i>AIP</i>	20	58	20	58	1,01
<i>myo</i>	22	58	21	58	0,99
<i>AP2</i>	20	58	21	58	1,06
<i>Aux/IAA</i>	23	59	22	60	0,93



**Figura 19.** Validação dos *primers* através do padrão de dissociação obtido após RT-qPCR. Amplificação dos cDNA de tangerina Poncan para os genes *expansina*, *CLV1-LRR*, *NBS-LRR*, *LRR-RLK*, *CBAp12*, *RKIP*, *AIP*, *myo*, *AP2* e *Aux/IAA*. Cada gene apresentou um único pico após curva de dissociação confirmando a especificidade de cada *primer*.

Em relação à seleção dos genes normalizadores, dos cinco pares de *primers* testados os que apresentaram melhor estabilidade foram a *ubiquitina* e a *ciclofilina*. Contudo, os outros três genes também apresentaram um valor M satisfatório (Figura 20). Esses *M-value* estão dentro dos valores aceitáveis, visto que, o valor de corte é 0.15 (Vandesompele *et al.*, 2002). Portanto, todos os genes selecionados podem ser utilizados como controles endógenos nos experimentos de Pera e Poncan infectados ou não com *X. fastidiosa* nos diferentes tempos de inoculação.

Com base nesses resultados os genes mais indicados como controles endógenos seriam *ubiquitina* e *ciclofilina*, pois foram os mais estáveis. Contudo, nós selecionamos os genes *ciclofilina* e *ETEF2*, visto que, eles não apresentaram variações significativas nos níveis de expressão nas análises do transcriptoma de tangerina Poncan (xilema) (Dados não mostrados). Portanto, foram selecionados bons normalizadores para a avaliação da expressão gênica tanto para amostras de laranja Pera, quanto para os cDNAs de tangerina Poncan, tecido foliar e xilemático, e em todos os tempos avaliados.



**Figura 20.** *M-value* dos genes candidatos à normalizadores. As barras de cor vermelha indicam os genes de *M-value* mais baixo.

Análises de RT-qPCR foram realizadas com dez genes para confirmar o padrão de expressão obtido no RNAseq de Poncan (Tabela 5). As amostras utilizadas foram de tecidos xilemáticos de Poncan, infectadas ou não (controle), com *X. fastidiosa*.

**Tabela 5.** Genes selecionados a partir das análises de RNAseq de Poncan para avaliação por RT-qPCR.

Gene	<sup>a</sup> id_Montagem	<sup>b</sup> id_Citrus clementine	fold change	*id_GO	*categoria_GO	*produto do gene	**nº acesso NCBI	similaridade (E-value)
<i>expansina</i>	NGS-CR-1148146	clementine0.9_019191m PACid:19261197	0,250	GO:0005576	cell wall organization or biogenesis	alpha-expansin 4	AAX38235.1	4,00E-51
<i>CLV1-LRR</i>	NGS-CR-1164791	clementine0.9_001457m PACid:19269785	0,750	GO:0016021	signaling	receptor protein kinase clavata1	XP_002510557.1	4,00E-129
<i>NBS-LRR</i>	NGS-CR-1245087	clementine0.9_035360m PACid:19269609	1,294	GO:0016787	hydrolase activity	cc-nbs-lrr resistance protein	Q9T048.1	2,00E-28
<i>LRR-RLK</i>	NGS-CR-1255018	clementine0.9_002663m PACid:19254796	1,660	GO:0009851	signaling	leucine-rich repeat receptor-like protein kinase	XP_002877545.1	4,00E-13
<i>CBAP12</i>	NGS-CR-1226862	clementine0.9_034300m PACid:19263042	1,822	GO:0005576	função Molecular	blight-associated protein p12	Q9ZP41.1	3,00E-92
<i>RKIP</i>	NGS-CR-1247162	clementine0.9_023420m PACid:19285502	2,010	GO:0016301	catalytic activity	flowering locus t	BAF96644.1	3,00E-42
<i>AIP</i>	NGS-CR-1204364	clementine0.9_033951m PACid:19286816	2,011	GO:0005739	função Molecular	auxin-induced protein	XP_002323220.1	5,00E-129
<i>myo</i>	NGS-CR-1214948	clementine0.9_000283m PACid:19262035	2,767	GO:0009851	metabolic process	myosin	XP_002281615.1	0.0
<i>AP2</i>	NGS-CR-1208699	clementine0.9_014064m PACid:19262960	2,011	GO:0008081	metabolic process	ap2 domain-containing transcription factor	Q9C688.1	1,00E-47
<i>Aux/IAA</i>	nd	clementine0.9_013163m PACid:19251252	4,000	GO:0009607	response to biotic stress	auxin sinaling protein F-box	XP_002269859.1	1,00E-98

<sup>a</sup> Identificação dos genes selecionados a partir do transcriptoma de tagerina Poncan desafiada com *X. fastidiosa*

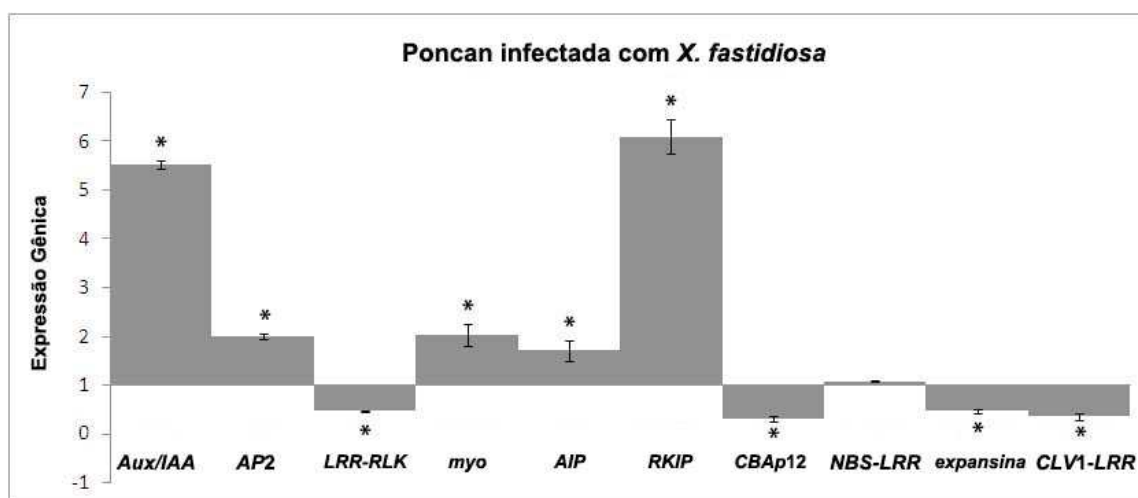
<sup>b</sup> Identificação dos genes de *C. clementina* (Genoma de referência utilizado na montagem da biblioteca)

\* <http://www.geneontology.org/>

Os genes *expansina* e *CLV1-LRR* foram significativamente reprimidos nas análises por RT-qPCR (Figura 21). Esses dois genes também apresentaram repressão significativa nos resultados do RNA-seq (Tabela 5).

Dos genes induzidos, segundo os resultados obtidos no RNA-seq, apenas *LRR-KLR* e *CBAP12* foram significativamente reprimidos nas análises de RT-qPCR. Contudo, os outros seis genes foram induzidos, assim como no RNA-seq (Figura 21, Tabela 5). Os genes *Aux/IAA*, *AP2* e *AIP* foram os que apresentaram níveis de indução mais próximos aos obtidos no RNA-seq. *RKIP* e *myo* apresentaram uma maior indução comparada aos valores observados nas análises do transcriptoma. O gene *NBS-LRR* apresentou indução em ambas as técnicas, contudo só foi significativo no RNA-seq (Figura 21, Tabela 5).

Nós realizamos a análise de correlação Spearman's Rho, que é uma medida de correlação não-paramétrica entre duas variáveis, para verificar a similaridade dos resultados obtidos entre as duas técnicas avaliadas. A correlação entre os resultados do RT-qPCR e RNA-seq foi de 0.84 indicando boa similaridade e, portanto, validando as análises do transcriptoma de tangerina Poncan.



**Figura 21.** Quantificação relativa dos genes selecionados a partir das análises do transcriptoma de tangerina Poncan através do RT-qPCR. Os cDNAs foram preparados utilizando RNA de tecido xilemático de Poncan infectado com *X. Fastidiosa* ou não (controle) após um dia, com três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle.



Para a realização das análises de expressão gênica através do RT-qPCR em *time course* (1, 7, 14 e 21 dias) foram utilizados RNAs totais extraídos de tecidos foliares de laranja Pera e tangerina Poncan, com três repetições biológicas, infectados ou não com *X. fastidiosa*.

Foram analisados genes relacionados às vias do SA, JA e ET, identificados no CitEST, além dos genes utilizados na validação do RNAseq (Tabela 5). Esses genes encontrados no transcriptoma de Poncan, a partir de tecidos xilemáticos, foram avaliados nas amostras foliares de laranja Pera e tangerina Poncan para verificar se a resposta iniciada no xilema é translocada para as folhas. Adicionalmente, foram avaliados dois genes *AP2* (*apetala2*/ethylene responsive factor) diferentes, sendo um identificado no CitEST e o outro no transcriptoma de Poncan, além de dois genes *NBS-LRR* na mesma condição. Essa diferença foi verificada após o alinhamento das sequências entre os genes da mesma família (Figura 22A e B).



**A**

**AP2**

Query - CitEST  
Query Length - 847  
Subject - Transcriptoma Poncan  
Subject Length - 516

NW Score= -820  
Identities= 348/854 (41%), Gaps= 341/852 (40%)

Query 1 A-ATTTATTTTGGGAAGGACCGGACGCTCCGGATTCCCGGGTCCACCCACGCGTC 59  
Sbjct 1 AGAATCATTAT--GGAAAGAGAGATG---TGAGCATT---GTTTCAATGTTGAGAC 50  
Query 60 CGGAA--GAT-CCAAAATCTTCAAGCCCAACAAAAGAAATTTTACATTTAACCCATT 115  
Sbjct 51 --GAATGTGATTCAGAAATTTGAGATTCAAATTAGAGACAC---TGCTTGA---TTT 99  
Query 116 CTCTCTAAAAATCTTTTCTTTTGTGCTGAAACAAACAGAAAGAGAGAAACCTTA 175  
Sbjct 100 C-CTGCAACCAAGTGTGTTG---AG-GC---ACACAAGTGCAGTCTC---AAAGTTCA 145  
Query 176 ACCATCTGTGGAGGTCTATCATTTCCGGCTACATCCCGCCACCGTCCGGGGCCGCA 235  
Sbjct 146 A--AGGTGTG---TAC-----CACAG-----CA 164  
Query 236 AAGAAGCTGACGGCGAATCTCTGGCCGGAGCTGAAGAGTCAATCCAAAGAAATAC 295  
Sbjct 165 AA-ATG---GGC---AT---TGG---GGTCTCAA-ATATATGCCAACAC--- 201  
Query 296 TCAAAGCCGATCTGCAAGTCTGAGGCTCAATTCAGAGATTCAGAGGATGAA 355  
Sbjct 202 -CAACG--GAT-----ATGGCTTGG---GACCTTCAA--ATCCGAAAAGGATGCT 243  
Query 356 GAACAGCTGCAATGATGATGACGTGACGTGATGCGGCACTGATGATGCTGATATT 415  
Sbjct 244 GCTATGGCTTA---TGATAGTGC--TGCA---AT-CAGGCTT-AGGAGTGTGGAATC- 290  
Query 416 AAGCCTTTCACCTTTCCAGCTGCTGCAAGTCTCATGGATCTACAGCCTGAAGCAGTT 475  
Sbjct 291 --GCATAGAAATTT-TCCG-TGGACG-AGA-TCA-----CTA-----TT 324  
Query 476 GAACAAGCTAAAATAATCCACAGAAAAGAGAGAAAGAAATCAATATAGGGGAATTAGGCAC 535  
Sbjct 292 -CAACG--GAT-----ATGGCTTGG---GACCTTCAA--ATCCGAAAAGGATGCT 243  
Query 536 GGTCCATGGGAAAATGGCTGCTGAGATCCGTGACCCCAAAAAGGGGCTTGTGCTGG 595  
Sbjct 293 -CAACG--GAT-----ATGGCTTGG---GACCTTCAA--ATCCGAAAAGGATGCT 243  
Query 365 TGATCA---ACATG---ATTAGGGAT---GGTTCATATTCAT 397  
Sbjct 294 GCTATGGCTTA---TGATAGTGC--TGCA---AT-CAGGCTT-AGGAGTGTGGAATC- 290  
Query 596 CTAGSAACTTCAATCCGCTGAAGAGCCCTGAGGCTTATGATCCCGAGGACGAGG 655  
Sbjct 295 --GAATGTGATTCAGAAATTTGAGATTCAAATTAGAGACAC---TGCTTGA---TTT 99  
Query 398 CTAGS---TTTGAGATTTCTTAAGAGTCAAT---CTA---GA-----AC----- 434  
Query 656 ATCCGTTGGGAAAAGCTAAGTTAACTTTCAGATGAACTCTGCTGCTGCTCCAAAG 715  
Sbjct 296 --GAATGTGATTCAGAAATTTGAGATTCAAATTAGAGACAC---TGCTTGA---TTT 99  
Query 435 TC--TGG-ANGAA-GAT--GTA--TTTTAC-----CCAGATG---AG 467  
Query 716 AGCTCAGTGAAGCAAACTTCCAGAAATCTGTTCCAAAAGCTTCCCTAAGCCCGTCA 775  
Sbjct 297 --GAATGTGATTCAGAAATTTGAGATTCAAATTAGAGACAC---TGCTTGA---TTT 99  
Query 468 AGC---AGGTA-----CCGATGG--ATGGATG---ATG---TGCA 496  
Query 776 CCCAACTTGAACCAAACTCAATTTCTTAACCAACTCCCGATCAGGATTACTACAACA 835  
Sbjct 298 --GAATGTGATTCAGAAATTTGAGATTCAAATTAGAGACAC---TGCTTGA---TTT 99  
Query 497 GGCAACTCT-----TTCAA-----AA-----GGAG 516  
Query 836 ATGTGAGTATTC 847

**B**

**NBS-LRR**

Query - CitEST  
Query Length - 1352  
Subject - Transcriptoma Poncan  
Subject Length - 470

NW Score= -1666  
Identities= 382/1354 (28%), Gaps= 886/1354 (65%)

Query 1 CCACGGGTCGAGAGATTGTATTTGTTGTAGATGATATATGGGAGCGGGTGAATTAAAC 60  
Sbjct 1 AGATGAGA-----AGATGAGA-----AAC 11  
Query 61 AGAAGTGGGGTTTCCACTTCCAGCCACAAAATACATCAAAAAGTCTGATTCAGACAC 120  
Sbjct 12 AGA-----TCTCAT-----TA-----TATTG--GA- 30  
Query 121 CCGTTTCATTGATGTTTGGTGTAGCATGGAAGTACAGAGAAAGTTAAAGTGGCATGCT 180  
Sbjct 31 -----TGATGTTG-----GGCA----- 43  
Query 181 ATCAGAGAGAGATGCTTGGGAGCTGTTTGGAGAAAAGTAGGGCAGGAAACTCTGAGAG 240  
Sbjct 44 --AGA-----CT-----CGA-----CCTGA-- 56  
Query 241 TGATCATGAGATCGTTGAGCTAGCCCAAACTGTGGCCAAAAGAGTGTGATGGTT-TGCCAC 299  
Sbjct 57 --AT-ATGA--TGG--GAGTT--CCCTTA---GG-----TGATGGTGTGGAAT 93  
Query 300 TGCACCTTATTAATTTGGCTGAGCTATGGCCACAGAAAAGAGCGGAGCAGTGGAGAC 359  
Sbjct 94 TC---TTGTAACACCCCGCG---GAAACAA-----GT---AT 12  
Query 360 GTGCAATTGAGCGTTAAGAAAGATGAGCTTCAAGATTTTCAGGTTTGGGAAAAGAGTGT 419  
Sbjct 123 GT-CA-----TTC-----CA-----TGGGGTGTGAG--- 142  
Query 420 ATTCCTCTTTAAATTCAGCTATGATGATGTTTTCAGAGATGATACGGTGTGATGTTTCT 479  
Sbjct 143 -TCCCC-----AATTC----- 152  
Query 480 TGTATGTTGTTTATATATCTGAAGATTTGGCATTTTAAATGGGACTTGATGATGTT 539  
Sbjct 153 -----CAIT----- 156  
Query 540 GGTGGGAGGAGGATTTTTTGGGAAATCTGACAGGCTTGGTGCAGAAACCAAGATATG 599  
Sbjct 157 -----GAT-----GCTCTTGTG--GAAAAGAGAGG--- 180  
Query 600 ACATTTTGGACACTTGTGTTGTCATGTTTATAGAAAGAGTGGAAAGATGATAAAGTAA 659  
Sbjct 181 -----TTGG---TT-----TTTTTAAAGA----- 199  
Query 660 AAATGCAATGAGCTTATCTGATATGCTATATGATAACCTTGAATTTGAGAAAGAGAGA 719  
Sbjct 200 -AATGCAATG---TATAGGTGAT-----GAACT----- 222  
Query 720 AGAGAAACTTTTTGGTCTGTCAGGTGCTGGATTAAGAGGGCAGCGGATGTTAAAGA- 778  
Sbjct 223 -----GCC-----CACC-----TAAATGAC 238  
Query 779 TGGAAAATGTGAGAAAGATTGCTATGATGCAAAACCAATTTGAAACTCTGTCAGAGGTT 838  
Sbjct 239 TGGCAAAAAGA-AGTAGCTAGAGA--ATGCAA-----GGGT 271  
Query 839 CCTACATGCCCTCATCTCTCACTTATTTCTTAACTTTAATAGGTGGAGATGATCGCG 898  
Sbjct 272 C-----TGCCCTTAGC-----AATTGTGA-CTATAGGAAG----- 300  
Query 899 GATGGCTTCTTCCAATTTATGCTTCTCTGAAAGTTTTTGAAGATGTCAGACTGCGGGAAAT 958  
Sbjct 301 -----TGC---TCTGAAG--GAA-----AGCCT--AT 321  
Query 959 TTAATTTTGAATACCTTTTGGGATGTCAAAGTTGGGTTCACTGGAACCTTCGATAT 1018  
Sbjct 322 TGA---TG-AAT-----GGAAATG---AST---GTT---GAA----- 345  
Query 1019 TCACATACCCACATAAAGAGATTAACAGAAAGATTAAGTTGTTGTTAAATCTGAAATGT 1078  
Sbjct 346 -----AAGAT-----GAA-----AAA-----TGGCAATTTG---TGG 371  
Query 1079 TTGAATTTGAGGTGGACAGTTTGGTTAAATAAATTTCCAGGGCACTAATATCAAAATCT 1138  
Sbjct 372 ATGTAGAGGATGTGGA---TGCTGACAT-----CTATGCTC--TTCT 408  
Query 1139 TCAAGGTACGTGTGTTGAGAAATGTCGCTATTGGCTGTTGCTCAATTTTCATGAAGATCA 1198  
Sbjct 409 TAAA-----TTGAG-----CTA-----CGATT----- 425  
Query 1199 GAAGAAAAGGTTTTTATTTGGGGGTTGAAAGTTTASTACAGGAATTTGCTGGTTTGA 1258  
Sbjct 426 -----ATTTGAAGGG--TGACG----- 443  
Query 1259 TATTTAGAGGTATGGAAGTTGACCTTGGGGAAGTTTACAGGCTCTCCAAATCTTTTGA 1318  
Sbjct 444 CA-----AAGTTAT--GTT-----TTTTG-- 460  
Query 1319 CTCAAAATTAATAAAGTGTATTCGATCTCT 1352  
Sbjct 461 -----TTGTGTTAC 470

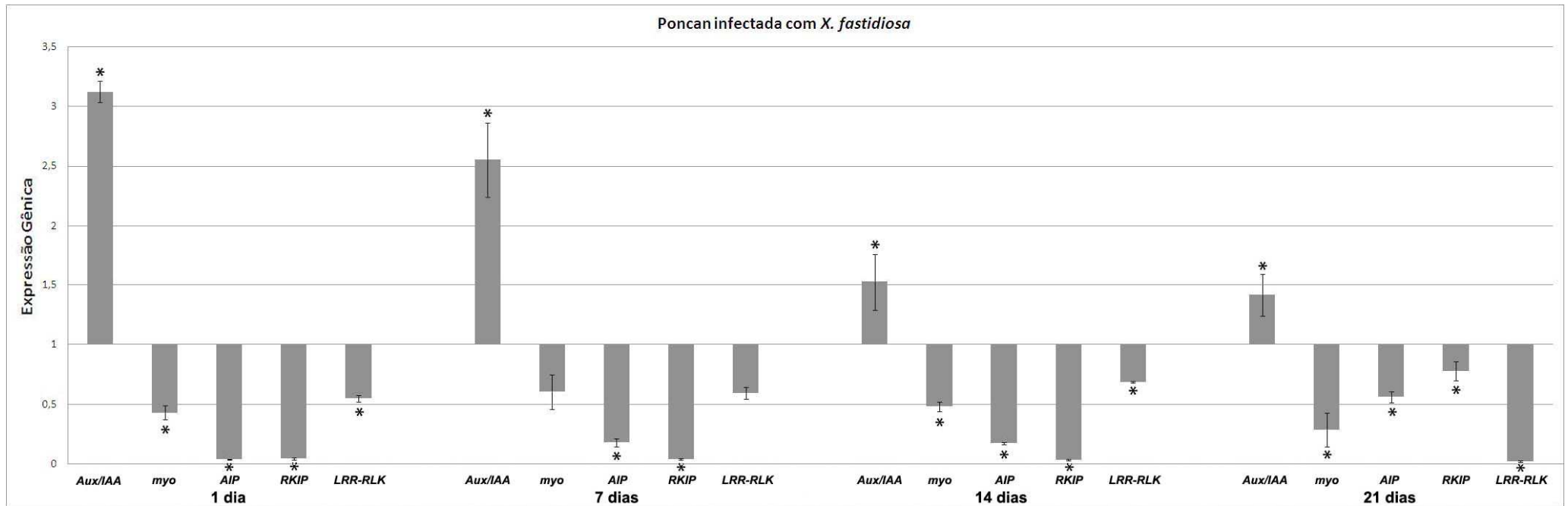
**Figura 22.** Alinhamento entre duas sequencias através da ferramenta Blast/Global Alignment (Needleman-Wunsch alignment of two sequences). **A.** Alinhamento entre sequencias de dois genes *AP2* (*apetala2*/ethylene responsive factor), sendo um proveniente do CitEST (Query) e o outro do Transcriptoma de Poncan (Subject). **B.** Alinhamento de dois genes *NBS-LRR*, onde um foi identificado no CitEST (Query) e o outro nas análises do Transcriptoma da tangerina Poncan (Subject).

Em relação aos genes selecionados a partir do RNA-seq, foi verificada a indução significativa de *Aux/IAA* em todos os tempos avaliados em tangerina Poncan (Figura 23). O gene *myo* foi reprimido significativamente com 1, 14 e 21 dias após desafio com a *X. fastidiosa*. *AIP*, *RKIP* e *LRR-RLK* também apresentaram repressão significativa em todos os tempos avaliados (Figura 23).

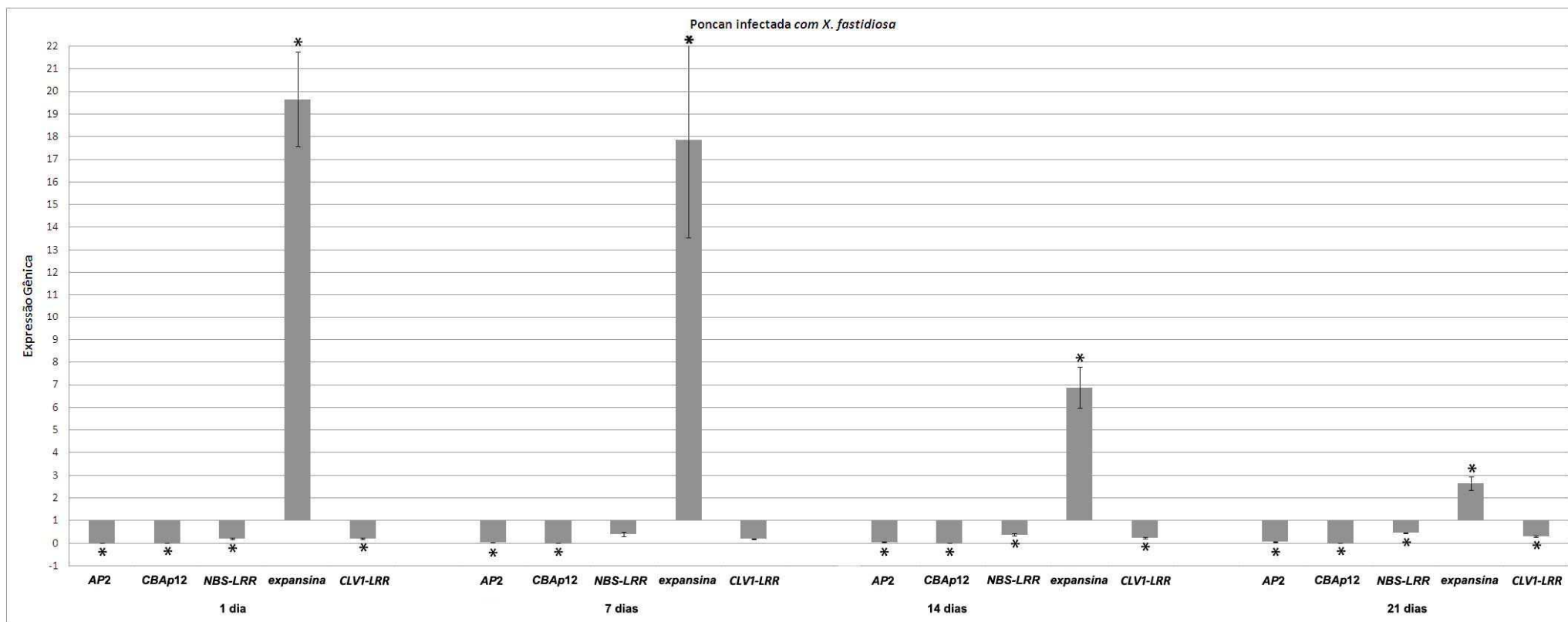
Adicionalmente, *expansina* foi induzida significativamente com 1, 7, 14 e 21 dias após infecção com a bactéria (Figura 24). *CBAp12*, *AP2*, *NBS-LRR* e *CLV1-LRR* foram reprimidos em todos os tempos, exceto *NBS-LRR* e *CLV1-LRR* com 14 dias (Figura 24).

Observando os resultados obtidos entre os tecidos foliares e xilemáticos de tangerina Poncan, verificamos mudanças nos níveis de expressão dos genes alvos. A *expansina* foi significativamente reprimida nos tecidos xilemáticos, porém apresentou indução nas folhas (Figuras 21 e 24). Esse gene está envolvido no processo de alongação das células após a divisão celular.

Outros exemplos foram os genes *AP2*, que é um fator de transcrição da via do ET, *myo*, que está envolvido no processo metabólico de auxina, *AIP*, o qual codifica para uma proteína que é induzida por auxina e *NBS-LRR*, um receptor de sinal molecular da bactéria que desencadeia a cascata de sinalização. Esses genes foram reprimidos nos tecidos foliares e induzidos no xilema de Poncan (Figuras 21, 23 e 24). Contudo, *Aux/IAA* foi induzido em ambos os tecidos. Esse gene está envolvido na transcrição de genes de respostas a auxina. Adicionalmente, *CLV1-LRR*, envolvido no desenvolvimento do meristema, também foi reprimido nas avaliações de RNA-seq e RT-qPCR (Figuras 21, 23 e 24).



**Figura 23.** Expressão dos genes selecionados a partir do transcriptoma de tangerina Poncan, tecido xilemático. Os genes alvos foram avaliados por RT-qPCR utilizando amostras de tecido foliar de Poncan com 1, 7, 14 e 21 dias após desafio com *X. fastidiosa* ou não (controle), com três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle.



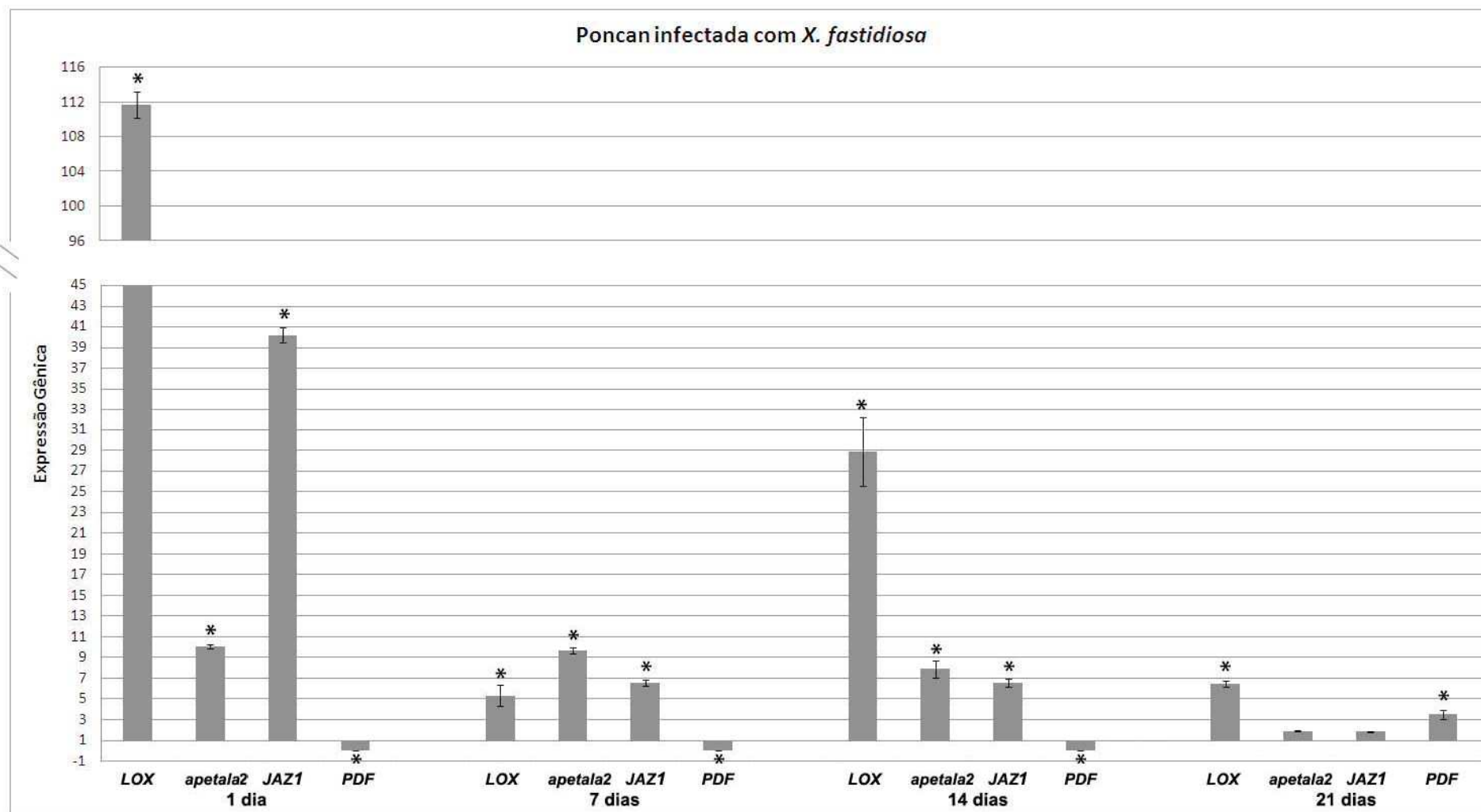
**Figura 24.** Expressão dos genes selecionados a partir do transcriptoma de tangerina Poncan, tecido xilemático. Os genes alvos foram avaliados por RT-qPCR utilizando amostras de tecido foliar de Poncan com 1, 7, 14 e 21 dias após desafio com *X. fastidiosa* ou não (controle), com três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle.

As amostras foliares de tangerina Poncan também foram utilizadas nas análises da expressão gênica dos genes obtidos no CitEST. Foram avaliados genes envolvidos nas vias de JA, ET e SA.

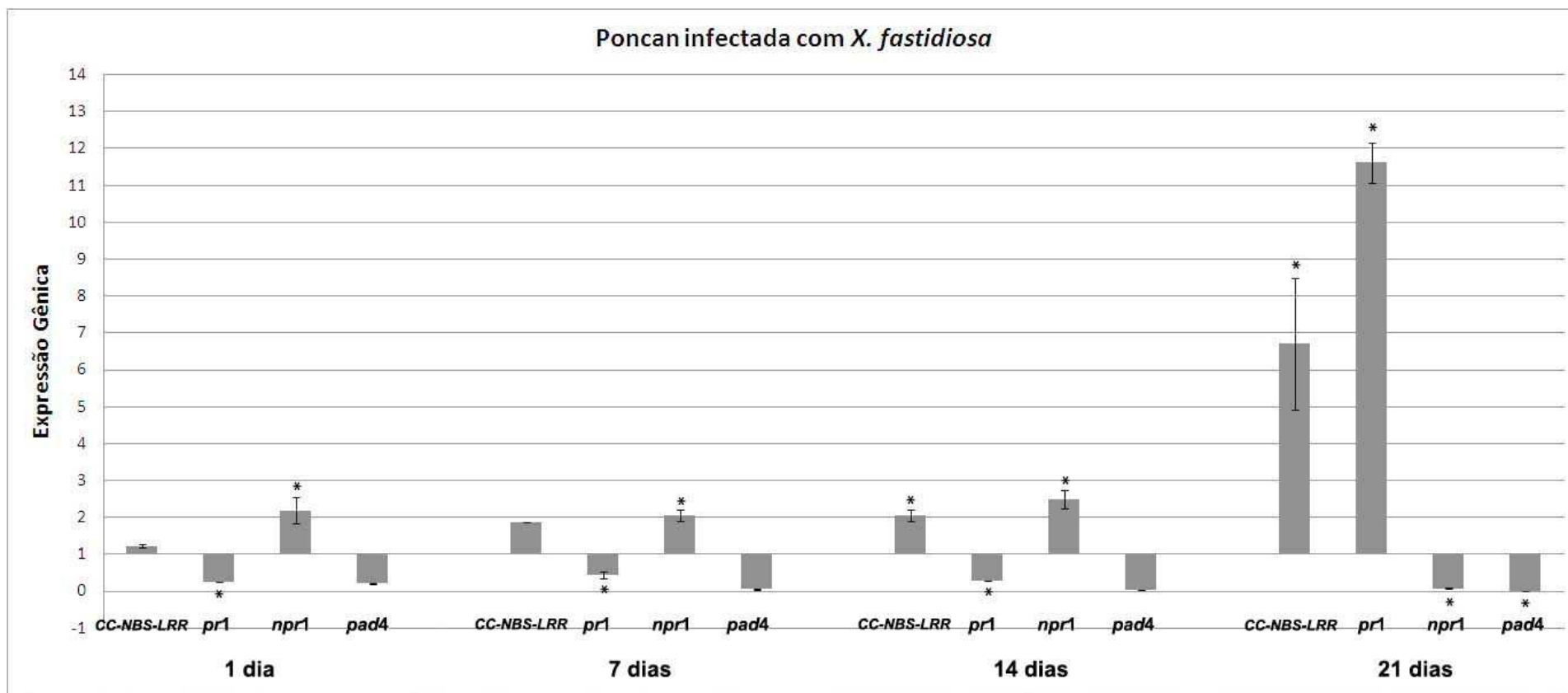
O gene *LOX* foi induzido em todos os tempos avaliados. Contudo, com um dia após a infecção apresentou uma indução mais expressiva em relação aos outros dias avaliados (Figura 25). *JAZ1* também se mostrou altamente expresso com dia. Essa indução se manteve significativa até 14 dias após desafio com *X. fastidiosa*, e já com 21 dias a expressão apresenta uma diminuição (Figura 25). Esses resultados demonstram que a via do JA está sendo ativada no início da infecção nos tecidos foliares, visto que, os genes *LOX* e *JAZ1* possuem um importante papel na expressão dessa via.

Os genes *apetala* e *PDF*, relacionados à via do ET, apresentaram expressões diferentes. *apetala2* foi induzido significativamente com 1, 7 e 14 dias, e assim como *JAZ1* apresentou uma redução no nível de expressão com 21 dias. Já *PDF* foi reprimido significativamente até 14 dias e com 21 dias apresentou indução significativa (Figura 25).

O gene *pad4*, o qual está envolvido na via do SA, foi reprimido em todos os tempos avaliados (Figura 26). Entretanto, *npr1*, envolvido na regulação de SAR, um mecanismo de defesa da planta que é disparado pelo acúmulo de SA, foi induzido significativamente até 14 dias (Figura 26). *PR1*, uma proteína relacionada à defesa da planta, também tem sua expressão mediada por SA. Esse gene foi induzido com 7, 14 e 21 dias, sendo a maior indução verificada com 21 dias (Figura 26). O gene *CC-NBS-LRR* foi induzido em todos os tempos, contudo, só foi significativo após 21 dias da infecção com *X. fastidiosa* (Figura 26). De maneira geral, aparentemente a via do SA começa a ser expressa mais tardiamente nas plantas de Poncan.



**Figura 25.** Expressão dos genes relacionados às vias do JA e ET identificados no CitEST. Os genes alvos foram avaliados por RT-qPCR utilizando amostras de tecido foliar de Poncan com 1, 7, 14 e 21 dias após desafio com *X. fastidiosa* ou não (controle), com três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle.



**Figura 26.** Expressão dos genes relacionados à via do SA identificados no CitEST. Os genes alvos foram avaliados por RT-qPCR utilizando amostras de tecido foliar de Poncan com 1, 7, 14 e 21 dias após desafio com *X. fastidiosa* ou não (controle), com três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle.

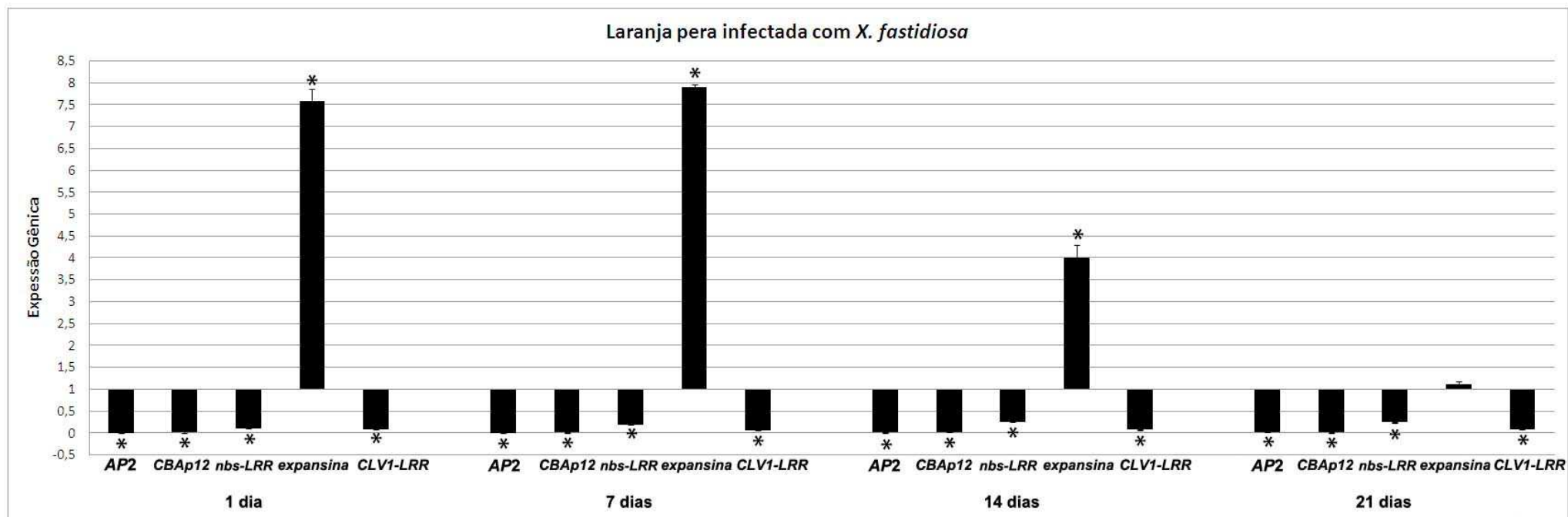
Nós também avaliamos a expressão dos genes identificados no transcriptoma de Poncan em tecidos foliares de laranja Pera, espécie suscetível a *X. fastidiosa*.

*expansina* foi o único gene que apresentou indução significativa em todos os tempos avaliados, com exceção de 21 dias que não foi significativo (Figura 27). O *NBS-LRR* não apresentou variação na expressão em relação ao controle (Figura 27). Contudo, todos os outros genes restantes foram significativamente reprimidos (Figura 27 e 28).

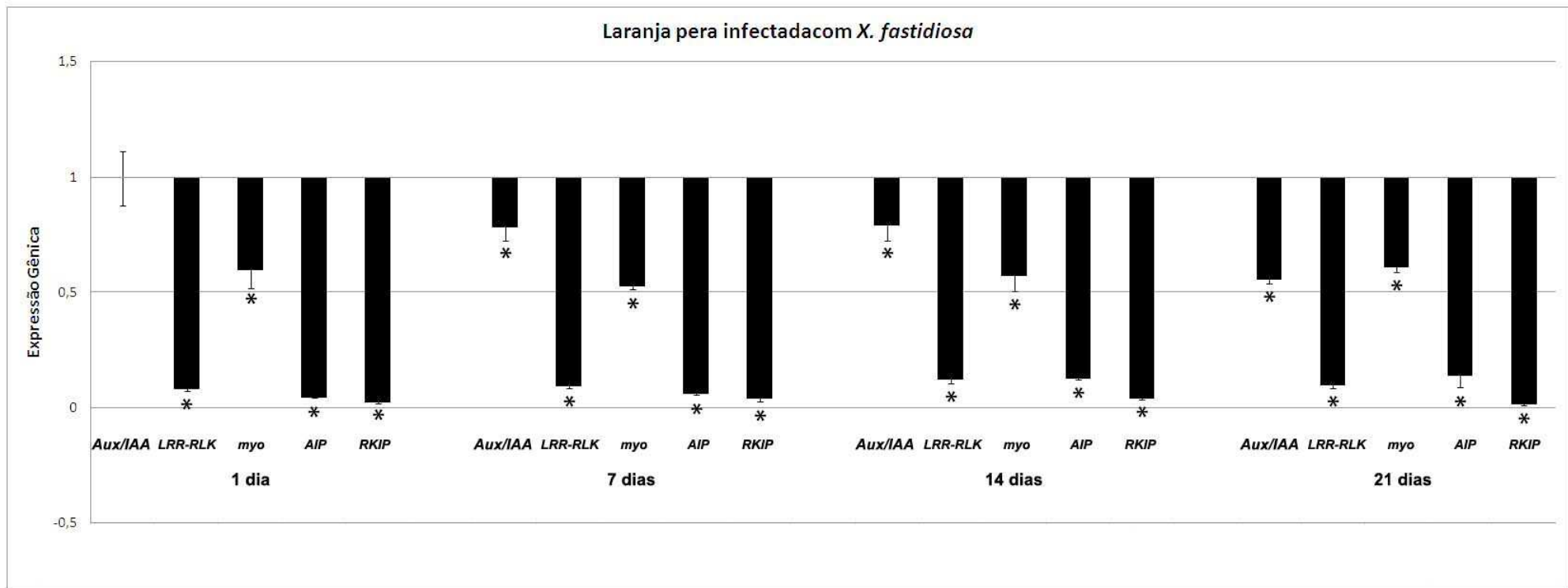
Adicionalmente, os genes selecionados a partir do CitEST também foram avaliados em laranja Pera.

Os genes *pad4* e *pr1*, relacionados a via do SA, foram reprimidos em todos os tempos avaliados (Figura 29). O mesmo resultado foi observado na expressão de *PDF*, envolvido na via do ET (Figura 29). Entretanto, os genes *LOX* e *JAZ1* envolvidos na via do JA, foram induzidos significativamente até 21 dias após desafio com o patógeno, exceto *JAZ1* avaliado após 21 dias não apresentou indução significativa. E por fim, o gene *apetala2*, um fator de transcrição da via do ET, apresentou resultados similares aos genes da via da JA (Figura 29).

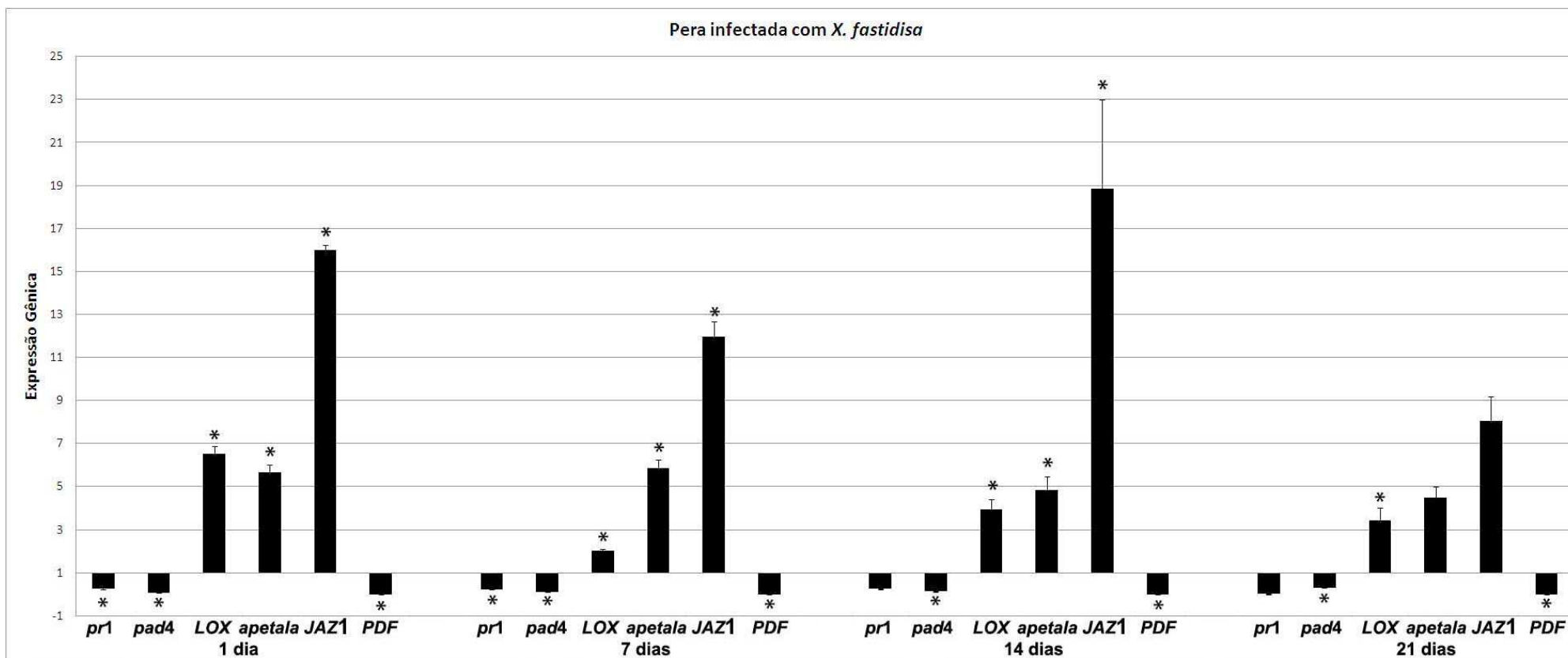




**Figura 27.** Expressão dos genes selecionados a partir do transcriptoma de tangerina Poncan, tecido xilemático. Os genes alvos foram avaliados por RT-qPCR utilizando amostras de tecido foliar de Pera com 1, 7, 14 e 21 dias após desafio com *X. fastidiosa* ou não (controle), com três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle.



**Figura 28.** Expressão dos genes selecionados a partir do transcriptoma de tangerina Poncan, tecido xilemático. Os genes alvos foram avaliados por RT-qPCR utilizando amostras de tecido foliar de Pera com 1, 7, 14 e 21 dias após desafio com *X. fastidiosa* ou não (controle), com três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle.



**Figura 29.** Expressão dos genes relacionados às vias do SA, JA e ET identificados no CitEST. Os genes alvos foram avaliados por RT-qPCR utilizando amostras de tecido foliar de Pera com 1, 7, 14 e 21 dias após desafio com *X. fastidiosa* ou não (controle), com três repetições biológicas. As barras indicam o desvio padrão entre as médias. (\*) Indica diferença significativa ( $P \geq 0.05$ ) entre as médias dos valores obtidos para cada gene comparado ao controle.

## 7. Discussão

Nos últimos anos têm crescido o número de estudos que utilizam análises de expressão global para o entendimento de interações planta/patógenos. Através da comparação de mRNAs específicos presentes em amostras diferentes, como por exemplo, infectadas ou não por patógenos, genes diferencialmente expressos podem ser identificados e, conseqüentemente, terem suas funções metabólicas inferidas.

No presente estudo nós utilizamos a técnica de biblioteca subtrativa supressiva (SSH) que utiliza a PCR em combinação com a supressão, a qual normaliza a abundância de sequências propiciando o enriquecimento de mRNAs raros, e assim, aumentando a probabilidade de se obter cDNAs pouco expressos (Rebouças & Gomes, 1999; Desai *et al.*, 2001). Contudo, não obtivemos sucesso utilizando essa metodologia para identificação de genes diferencialmente expressos em citros. Então, nós optamos pela técnica de RNA-seq que permite analisar transcriptomas complexos, independente de conhecimento prévio do genoma, além de possibilitar o mapeamento e quantificação de transcriptomas, principalmente quando existe um genoma de referência para proceder às comparações (Tang *et al.*, 2009; Filichkin *et al.*, 2010).

Esse trabalho analisou a expressão diferencial de tangerina Poncan, resistente, e laranja Pera, suscetível, em resposta a *X. fastidiosa* nos estágios iniciais de infecção. Nossa hipótese era que essa resposta de resistência e susceptibilidade poderia ser comparada através da avaliação da expressão diferencial durante o processo de infecção. Um fato que reforça essa idéia foi o resultado de um trabalho realizado pelo nosso grupo, onde foram avaliadas plantas de laranja doce, suscetível, tangor “Murcott”, resistente, e híbridos desses dois gêneros de citros com variações nas respostas frente a *X. fastidiosa* (Coletta-Filho *et al.*, 2007). Este estudo objetivou verificar se a resistência das tangerinas poderia ser atribuída a um maior diâmetro dos vasos do xilema em relação à laranja, visto que, os sintomas da CVC estão preponderantemente associados ao bloqueio dos vasos do xilema pela colonização bacteriana (Hopkins, 1989). Como resultado, os autores concluíram que não há diferença entre híbridos suscetíveis e resistentes, em relação ao diâmetro dos vasos do xilema, que poderia explicar essa resistência.

Após a essa confirmação, nosso grupo começou a investigar o padrão de expressão gênica, através de sequências expressas (ESTs) dessas duas espécies de citros em resposta à *X. fastidiosa*. Essa análise, baseada em transcriptoma obtido por

sequenciamento Sanger, foi feita em tecidos após 30 dias da infecção inicial com a bactéria em laranja Pera e tangerina Poncan. Os resultados revelaram padrão diferencial de expressão nas plantas infectadas, com vários genes relacionados à defesa em vias de sinalização do ácido salicílico (SA), jasmonato (JA) e etileno (ET) (De Souza *et al.*, 2007a; 2007b; 2009). Esses resultados demonstraram a interação ativa entre a planta e a bactéria e a busca do melhor entendimento de mecanismos envolvidos nessa interação, utilizando como modelo genótipos suscetível (laranja doce) em contraposição a genótipos tolerantes ou resistentes (tangerina Poncan).

Como a bactéria é limitada ao xilema das plantas hospedeiras, e sua colonização acarreta na formação do biofilme resultando no bloqueio dos vasos, sendo considerado o principal mecanismo de patogenicidade (Leite *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2004; Osiro *et al.*, 2004; Guilharbert & Kirkpatrick, 2005), decidimos concentrar na análise de transcriptoma em tecido cambial enriquecido com xilema. Para tanto, nós utilizamos tecidos xilemáticos na análise de expressão global e depois avaliamos alguns genes com expressões diferenciais em *time course* por RT-qPCR, para acompanhar a expressão durante o processo de infecção. Essa segunda análise foi feita em tecidos foliares com o intuito de avaliar se a resposta iniciada no xilema é translocada para outras partes da plantas.

Na análise do transcriptoma de tangerina Poncan foi observada a repressão de genes relacionados ao crescimento e diferenciação celular, como por exemplo, os fatores de transcrição *myb* (*ALP*) e *ndr* (*NDL2*), um receptor kinase (*CLV1-LRR*) e o fator de transcrição *ccr4* (*ccr4-associated factor 1-6*). Este último é responsável pelo crescimento, mas parece estar associado com a indução de PR proteínas. Mutante de *Arabidopsis* para esse gene foi incapaz de transcrever *pr1*, que é normalmente transcrita a partir da ativação da via do SA (Sarowar *et al.*, 2007). Esse fato poderia explicar a repressão de genes relacionados à via do SA observadas aqui, tanto em tangerina Poncan, nos primeiros tempos avaliados, quanto em laranja Pera.

O gene que codifica para uma Expansina, também foi reprimido em tangerina após infecção com a *X. fastidiosa*. Essa proteína tem a função de afrouxar a parede celular durante o crescimento (McQueen-Mason *et al.*, 1992). Quando ocorre o afrouxamento da parede celular as plantas tornam-se mais vulneráveis ao ataque dos patógenos. Por esse motivo, muitos deles produzem IAA como fator de virulência no ataque às plantas (Maor *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007; Reineke *et al.*, 2008).

Por outro lado, nossos resultados indicam que tangerina Poncan ativa a via de sinalização de auxina após a infecção da bactéria. Muitos trabalhos têm relatado a ativação dessa via na resposta de defesa a estresses bióticos e abióticos (Choeng *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007; Jain *et al.*, 2009). Nós encontramos o gene da proteína MYO (*myo*) envolvida na biossíntese de auxina significativamente induzida. Fu e colaboradores (2011) sugerem que em arroz a acumulação de auxina no local da infecção, em parte, é devido à ativação da biossíntese de ácido indolacético (IAA), induzida pelo IAA produzido por alguns patógenos.

A *X. fastidiosa* possui genes da via do triptofano que é precursor de auxina. Além disso, foi encontrado no genoma dessa bactéria um gene hipotético de efluxo de auxina (XF1514) ([aeg.lbi.ic.unicamp.br/aeg/aeg.html](http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/aeg/aeg.html)). Essas evidências sugerem que *X. fastidiosa* também possa utilizar a auxina como fator de virulência, e assim induzir a planta a sintetizar IAA. Essa hipótese é reforçada pelos resultados obtidos nesse trabalho, onde nós verificamos a indução de um receptor do tipo LRR de auxina nas plantas de tangerina Poncan infectadas com a bactéria.

Outros genes envolvidos na via da auxina foram induzidos nos tecidos xilemáticos de tangerina Poncan, entre eles o *Aux/IAA*. Altas concentrações de auxina na planta promovem a indução de várias classes de genes conhecidos como genes de resposta primária à auxina, como *Aux/IAA*, *CH3* e *SAUR*. Estes estão envolvidos nas respostas de defesa das plantas contra o ataque de patógenos (Abel & Theologis, 1996; Hagen & Guilfoyle, 2002; Prigge *et al.*, 2010). Adicionalmente, também foi identificada nesse trabalho uma kinase (RKIP) induzida em Poncan frente a *X. fastidiosa*, a qual provavelmente está envolvida na cascata de sinalização ativada por auxina.

Outro fator de transcrição induzido em tangerina Poncan foi *AP2* (*apetala2*), o qual está relacionado à ativação de respostas de defesa via etileno (Glazebrook, 2005; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Recentemente foi demonstrado mecanismo de interação das vias de auxina e etileno nas raízes de *Arabidopsis*, onde ambos os hormônio podem reciprocamente induzir a biossíntese um do outro (Stepanova *et al.*, 2007). Com base nessa informação é possível inferir o *crossstalk* envolvendo essas duas vias de sinalização na defesa de Poncan nos tecidos xilemáticos.

Adicionalmente, nós encontramos vários outros genes induzidos em tangerina Poncan típicos de respostas de defesa. Foram encontrados genes relacionados à respostas de estresses, como *HSP70*, *HSP20*, *HSP81-1*, *DnaJ*, *peroxidase* e *P450* (Fietto *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2007 b; 2009). Também foram identificados genes envolvidos na

síntese e organização da parede celular, como celulose sintase e HPT (homogentisate phytyltransferase), sugerindo uma proteção física contra o patógeno. Além desses, vários transportadores de íons envolvidos na detoxificação das células também foram identificados. Esses resultados corroboram as respostas observadas em tangerina Poncan após 30 e 60 dias da inoculação com *X. fastidiosa* (Souza *et al.*, 2007 b; 2009).

Curiosamente, um gene que codifica para NBS-LRR foi diferencialmente expresso nos tecidos xilemáticos de tangerina Poncan desafiada com a bactéria. Proteínas dessa classe estão normalmente envolvidas em respostas no reconhecimento de proteínas Avr secretadas pelos patógenos. Esse resultado sugere que essa proteína também possa estar envolvida na percepção de PAMPs (Souza *et al.*, 2009). No sistema imune inato de plantas, como de animais, as NBS-LRR estão mais envolvidas no reconhecimento de PAMPs do que efetores dos patógenos (Chamaillard *et al.*, 2005). No entanto, na avaliação nas folhas de Poncan em *time course*, esse gene não apresentou indução, indicando estar funcional somente no xilema.

Outros genes identificados no transcriptoma de tangerina Poncan também foram avaliados por RT-qPCR em tecidos foliares em *time course*. Nós verificamos a indução de *Aux/IAA* em folhas de tangerina. Essa expressão foi alta com um dia após a inoculação e foi diminuindo gradativamente ao longo dos tratamentos avaliados. Esses resultados sugerem que não ocorre a ativação da via de auxina nas folhas, visto que, apesar de *Aux/IAA* apresentar-se expresso, os outros genes envolvidos com auxina foram reprimidos. Outro fato que reforça essa idéia foi a indução de Expansina, indicando que, neste caso a auxina esteja desempenhando o papel de promover o alongamento das células. Com base nesses resultados, pode-se fazer algumas inferências. A primeira é que a resposta de auxina não é translocada do xilema para outras partes da planta, ou os tempos avaliados não foram suficientes para detectar essa resposta nas folhas. Outra possibilidade é a interação entre as vias de auxina e JA, vista a indução expressiva de *LOX* e *JAZ1* que estão relacionados à via de sinalização do JA nas análises de RT-qPCR. Isto está de acordo com um trabalho onde foi observada a diminuição da concentração de JA em um mutante de *A. thaliana* com perda de função de um receptor de auxina (Nagpal *et al.*, 2005). Mais uma evidência dessa interação é que os fatores de resposta a auxina ARF8 e ARF6 promoveram a biossíntese de JA (Tabata *et al.*, 2010). Além disso, JAZ é induzida pelo tratamento de auxina (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011).

*AP2*, induzido no tecido xilemático de tangerina Poncan, foi reprimido nas folhas. Entretanto, o gene *apetala2*, identificado no CitEST, apresentou indução em folhas de

tangerina após infecção com *X. fastidiosa*. Esses resultados indicam que esses dois fatores de transcrição podem ter função tecido-específica. Adicionalmente, como já comentado, as vias de auxina e etileno também interagem, portanto a indução desse fator de transcrição poderia estar relacionada à presença de auxina. Porém, o *crosstalk* das respostas mediadas por JA/ET também já foi verificada (Glazebrook, 2005). A comunicação entre essas duas rotas convergem na ativação de ERF1, que regula a expressão de genes de resposta a patógenos (Lorenzo *et al.*, 2003).

Outro gene avaliado foi *PDF*, uma defensina que é induzida pelas vias JA/ET. Esperava-se que esse gene fosse induzido pelo fato da ativação das vias JA/ET, contudo ele foi reprimido, exceto com 21 dias após infecção. Em *A. thaliana* PDF1.4 está associada a via de SA (Broekaert *et al.*, 2006).

Ficou evidente que a primeira resposta de tangerina Poncan contra o ataque de *X. fastidiosa* está relacionada a via de auxina, principalmente no xilema, e a ativação das vias JA/ET. Apesar da *X. fastidiosa* ser uma bactéria biotrófica, as respostas apresentadas pela planta foi tipicamente respostas de defesa contra organismos necrotróficos (Glazebrook, 2005). Este fato por ser explicado pelo modo de transmissão dessa bactéria que é feita por cigarrinhas (Hemíptera: Cicadellidae) que se alimentam da seiva do xilema das plantas (Hopkins, 1989). Outra possível explicação seria a movimentação sistêmica da bactéria nos vasos do xilema, que ocorre através da degradação da parede celular da planta por exoenzimas (Newman *et al.*, 2003).

Contudo, os genes relacionados às vias de JA/ET exibiram uma diminuição na expressão aos 21 dias de infecção. Apenas *LOX* apresenta indução significativa nesse último tempo avaliado, porém com uma drástica redução da expressão quando comparada com a apresentada após um dia da infecção com *X. fastidiosa*. Isso indica que as vias do JA e ET agem mais ativamente no início da infecção.

Ao contrário do que foram observados para os genes relacionados às vias de JA/ET, genes associados à via do SA não foram induzidos no início da infecção em tangerina Poncan. O gene *CC-NBS-LRR*, selecionado a partir do CitEST, apesar de ser induzido em todos os tempos avaliados, somente foi significativo nos dois últimos tempos avaliados (14 e 21 dias após infecção). Como discutido acima, esse gene pode perceber algum sinal da bactéria, como por exemplo, exopolissacarídeos, exoenzimas ou fragmentos de parede celular liberados após degradação pela bactéria. Levando em consideração o crescimento lento da *X. fastidiosa*, e a possível indução de *CC-NBS-LRR* pelos fatores citados acima, isso poderia explicar essa resposta ser mais tardia. Mais uma



evidência disso é a indução de *pr1* somente com 21 dias após infecção. PRs-1 são utilizadas como marcadores de resposta de defesa mediada por SA (Van Loon *et al.*, 1999). Contudo, *pad4* foi reprimido em todos os tempos avaliados em Poncan. PAD4 interage com EDS1 e ativam a sinalização de SA, além de serem recrutados em respostas do tipo ETI iniciadas por TIR-NBS-LRR (Wiermer *et al.*, 2005). Talvez pelo fato da NBS-LRR ser do tipo CC e não TIR, *pad4* não foi ativado. Outro fato interessante foi a indução *PDF* somente com 21 dias. Como discutido acima, esse gene pode ser induzido via SA e, portanto, seu padrão de expressão foi similar aos genes envolvidos na via de SA. Adicionalmente, nós avaliamos *npr1*, que é um regulador positivo da sinalização de SA (Dong, 2004). Curiosamente esse gene apresentou padrões de expressão parecidos com os genes relacionados às vias de JA/ET, visto que, foi induzido significativamente até 14 dias após infecção com a bactéria e reprimido aos 21 dias. Esse fato infere que NPR1 possa estar regulando as vias de JA/ET. Isso está de acordo com os resultados de Ramírez *et al.* (2010) que encontraram um regulador transcricional que modula a função de NPR1 em respostas de defesa mediadas por JA.

Os genes selecionados a partir do transcriptoma de tangerina Poncan também foram avaliados em tecidos foliares de laranja Pera em *time course*. Com exceção do gene *expansina*, todos os outros foram significativamente reprimidos em todos os tempos. Esses resultados demonstram a ausência da ativação da via de auxina nessas plantas desafiadas com a *X. fastidiosa*. Adicionalmente, a indução da *expansina* pode ser explicada pela sua função de alongamento das células após a diferenciação celular. Esse resultado pode estar associado ao experimento ter sido realizado com plantas com brotações novas.

A expressão das vias de SA, JA e ET também foram avaliadas em laranja Pera. Nós verificamos a indução dos genes envolvidos nas vias de JA e ET, que assim como em Poncan, aos 21 dias ocorreu uma diminuição da expressão desses genes. Nas análises de ESTs realizadas pelo nosso grupo, também foram encontrados genes de resposta a estresse em laranja Pera infectada com *X. fastidiosa*, contudo a expressão desses genes não foi suficiente para evitar o bloqueio dos vasos pela bactéria (Souza *et al.*, 2007a). Outro fato importante observado no presente trabalho é a falta de expressão dos genes relacionados à via do SA indicando que essa via não é ativada em laranja Pera após desafio com o patógeno.

Duas diferenças marcantes nas análises de expressão gênica entre tangerina Poncan e laranja Pera foram observadas. A primeira foi a ausência da indução da via da

auxina em laranja Pera e evidente expressão nos tecidos xilemáticos de tangerina. A outra foi que mesmo laranja Pera induzindo genes relacionados às vias do JA/ET, quando comparada a observada em tangerina, foi muito menor, principalmente para o gene *LOX*, um marcador da via do JA. Esses resultados confirmam nossa hipótese de que existe uma expressão diferencial entre a espécie resistente e suscetível de citros contra a infecção de *X. fastidiosa*.

Contudo, devemos lembrar que resistência e suscetibilidade estão relacionadas a diversos fatores, como morfologia da planta, características fisiológicas e modulação da expressão gênica. Aqui nós discutimos que em relação à morfologia da planta, nenhuma diferença foi encontrada que pudesse atribuir a resistência das tangerinas a *X. fastidiosa*. Porém, recentemente foi relatado em plantas de uva, que por analogia das respostas patógeno/hospedeiro, que fatores como concentração e conteúdo específicos do fluido do xilema, como aminoácidos e açúcar, podem afetar o crescimento, agregação e formação do biofilme de *X. fastidiosa* de acordo com o hospedeiro (Bi *et al.*, 2007). No entanto, ficou evidente nesse trabalho a importância da expressão gênica diferencial na resposta de resistência e suscetibilidade de tangerina Poncan e laranja Pera, respectivamente.

Atualmente muitos trabalhos têm demonstrado o *crosstalk* entre as vias de sinalização hormonais (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Esses autores levantam a questão da falta de estudos temporais sobre as mudanças hormonais durante a infecção por patógenos. Contudo, esse trabalho abrangeu o estudo temporal durante a infecção de dois gêneros de citros, um resistente e outro suscetível, em resposta a *X. fastidiosa* e demonstrou que as respostas de defesa envolvem a ativação de diferentes vias hormonais em locais e momentos diferentes na planta durante a infecção. Essa dinâmica parece ser essencial para a resistência de tangerina Poncan ao desafio com a bactéria.

## 8. Referências Bibliográficas

- ABAD, L.R.; DURZO, M.P.; LIU, D.; NARASIMHAN, M.L.; REUVENI, M. Antifungal activity of tobacco osmotic has specificity and involves plasma membrane permeabilization. **Plant Sci**, v.118, p.11-23, 1996.
- ABEL, S. & THEOLOGIS, A. A polymorphic bipartite motif signals nuclear targeting of early auxin-inducible proteins related to PS-IAA4 from pea (*Pisum sativum*). **Plant J**, v.8, p.87-96, 1995.
- ABEL, S & THEOLOGIS, A. Early genes and auxin action. **Plant Physiol**, v.111, p. 9-17, 1996.
- ABECITRUS. **Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos**. Ribeirão Preto, 2007. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>.
- ABECITRUS. **Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos**. Ribeirão Preto, 2008. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br/>>.
- AFZAL, A.J.; WOOD, A.J.; LIGHTFOOT, D.A. Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. **MPMI**, v. 21, n. 5, p.507-517, 2008.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathol**, Academic Press, San Diego, p.635, 1997.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathol**, 5th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, p.922, 2005.
- ADIE, B.A.T.; PÉREZ-PÉREZ, J.; PÉREZ-PÉREZ, M.; GODOY, M.; SERRANO, J.J.S.; SCHMELZ, E.A.; SOLANO, R. ABA Is an Essential Signal for Plant Resistance to Pathogens Affecting JA Biosynthesis and the Activation of Defenses in Arabidopsis. **The Plant Cell Preview**, [www.aspb.org](http://www.aspb.org), p.1-17.
- ALLAN, A.C. & FLUHR, R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. **Plant Cell**, v.9, p.1559-72, 1997.
- ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H. et al. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Dis**, v.85, n.4, p.382-386, 2001.
- ALVAREZ, M.E.; PENNELL, R.I.; MEIJER, P.J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, v.92, p.773-84, 1998.
- AMARO A.A.; MAIA M.L.; GONZALES M.A. Economic effects originated from citrus variegated chlorosis. In: Donadio LC, Moreira CS, eds. **Citrus Variegated Chlorosis**. Bebedouro, Brazil: Fundecitrus, p. 123-39, 1998.
- AMARO, A.A. & SALVA, R.A. Production of citrus nursery trees in São Paulo State: an economic vision. In: **INT. CONG. CITRUS NURSERYMEN**, Ribeirão Preto. Proceedings... Ribeirão Preto, v.6, p.55-66, 2001.
- AMARO, A.A.; VICENTE, M.C.M.; BAPTISTELLA, C.S.L. Citricultura paulista: tecnologia e mão de obra. **Laranja**, v.22, n.1, p.1-37, 2001.
- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ORNTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v.64, p.5245-5250, 2004.
- ANDREAS, P.M. et al. Sampling the *Arabidopsis* transcriptome with massively parallel pyrosequencing. **Plant Physiol**, v.144, p.32-42, 2007.
- AMRIT, N.K.; ANDRIO, E.; MARINO, D.; PAULY, N.; DUNAND, C. Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. **J Integr Plant Biol**, v.52, n.2, p.195-204, 2010.
- APEL, K. & HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Ann Plant Biotechnol**, v.55, p.373-99, 2004.
- ARTICO, S.; NARDELI, S.M.; BRILHANTE, O.; GROSSI-DE-SA, M.F.; ALVES-FERREIRA, M. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. **BMC Plant Biol**, v.21, p.10-49, 2010.
- BAI, X.; YANG, L.; YANG, Y.; AHMAD, P.; YANG, Y.; HU, X. Deciphering the protective role of nitric oxide against salt stress at the physiological and proteomic levels in maize. **J Proteome Res**, v.10, n.10, p.4349-64, 2011.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v.276, p.726-733, 1997.
- BÉCOT, S.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; MONOT, C.; SILUÉ, D. Fitogard (K<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) induces localized resistance in cauliflower to downy of crucifers. **Crop Protection**, Guildford, v.19, p.417-425, 2000.
- BERETTA, M.J.G.; BARTHE, G.A.; CECCARDI, T.L. et al. A survey for strains of *Xylella fastidiosa* in citrus affected by Citrus Variegated Chlorosis and Citrus Blight in Brazil. **Plant Dis**, v.81, n.10, p.1196-1198, 1997.
- BERNET, G.P.; BRETÓ, M.P.; ASINS, M.J. Expressed sequence enrichment for candidate gene analysis of citrus tristeza virus resistance. **Theor Appl Genet**, v.108, p.592-602, 2004.

- BESSER, K.; JAROSH, B.; LANGEN, G.; KOGEL, K.H. Analysis of gene induced in barley after chemical activation reveals distinct resistance pathways. **Mol Plant Pathol**, London, v.1, p.27-286, 2000.
- BI, J.L.; DUMENYO, C.K.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; COOKSEY, D.A.; TOSCANO, N.C. Effect of Host Plant Xylem Fluid on Growth, Aggregation, and Attachment of *Xylella fastidiosa*. **J Chem Ecol**, v.33, p.493-500, 2007.
- BLUME B.; NÜRNBERGER T.; NASS N.; SCHEEL, D. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. **Plant Cell**, v.12, p.1425-40, 2000.
- BOAVA, L. P.; LAIA, M.L.; JACOB, T.R.; DABBAS, K.M., GONÇALVES, J.F.; FERRO, J.A.; FERRO, M.IT.; FURTADO, E.L. Selection of endogenous genes for gene expression studies in Eucalyptus under biotic (*Puccinia psidii*) and abiotic (acibenzolar-S-methyl) stresses using RT-qPCR. **BMC Res Notes**, n.3, v.43, p.1-9, 2010.
- BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M. & CORNELISSEN, B.J.C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Ann. Rev. Phytopathol**, v.28, p.113-38, 1990.
- 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**, v.60, p.379-406, 2009.
- BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F.; ROMEIRO, R.S. Indução da resistência: Noções básicas e perspectivas. In: Cavalcanti, L.S.; Piero, R.M.; Cia, P.; Pascholati, S.F.; Resende, M.L.V.; Romeiro, R.S. (Ed). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 11-28, 2005.
- BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. **Physiol Mol Plant Pathol**. London, v.55, p.99-109, 1999.
- BRAAM, J.; SISTRUNK, M.L.; POLISENSKY, D.H.; XU, W.; PURUGGANAN, M.M.; ANTOSIEWICZ, D.M.; CAMPBELL, P.; JOHNSON, K. A. Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the *Arabidopsis* TCH genes. **Planta**, v.203, p.S35-S41, 1997.
- BROEKAERT, W.F.; DELAURE, S.L.; DE BOLLE, M.F.; CAMMUE, B.P. The role of ethylene in host-pathogen interactions. **Annu Rev Phytopathol**, v.44, p.393-416, 2006.
- BURNETTE, R.N.; GUNESEKERA, B.M.; GILLASPY, G.E. An *Arabidopsis* inositol 5-phosphatase gain-of-function alters abscisic acid signaling. **Plant Physiol**, v.132, p.1011-9, 2003.
- CAMPOS, M.A.; RESENDE, M.L.V.; SILVA, M.S. Interações moleculares planta-patógeno. In: Faleiro, F.G.; Andrade, S.R.M. de; Reis Jr., F. B. (Ed).. (Org).. (Org).. **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. p.355-377. 1 ed. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2010, v. , p.355-377.
- CAPLAN, J.; PADMANABHAN, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Plant NB-LRR Immune Receptors: From Recognition to Transcriptional Reprogramming. **Cell Host & Microbe**, v.3, p.126-135, 2008.
- CARVALHO, M.C.G. & SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, 2010.
- CASADO, V. **Pólos de fruticultura crescem no Paraná**. Grupo de Consultores em Citros, Cordeirópolis, 06 julho de 2004.
- CHAGAS, C.M.; ROSSETI, V.; BERETTA, M.J.G. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **J. Phytopathol**, v.134, p.306-312, 1992.
- CHANG, C.J.; GARNIER, M.; ZREIK, L.; ROSSETTI, V. et al. Citrus variegated chlorosis: cultivation of the causal bacterium and experimental reproduction of the disease. In: Conference of the International Organization of citrus virologists, 12., Riverside, 1993. **Proceedings**...p.294-300.
- CHAMAILLARD, I.; MCDONALD, C.; NUNEZ, G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. **Annu Rev Bioche.**, v.74, p.355-383, 2005.
- CHAO, Q.; ROTHENBERG, M.; SOLANO, R.; ROMAN, G.; TERZAGHI, W.; ECKER J.R. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. **Cell**, v.89, p.1133-1144, 1997.
- CHISHOLM S.T.; DAHLBECK, D.; KRISHAMURTHY, N.; DAY, B.; SJOLANDER, K.; STASKAWICZ, B.J. Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, p.2087-92, 2005.
- CHOENG, Y.H.; CHANG, H.S.; GUPTA, R.; WANG, X.; ZHU, T.; LUAN, S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress and hormonal responses in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v.129, p.661-77, 2002.
- CHOI, D.; BOSTOCK, R.; AVDIUSHKO, S.; HILDEBRAND, D. Lipid derivate signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathway in plants: methyl jasmonate and fungal elicitor arachidonic acid induced different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, p.2329-33, 1994.

- CIPOLLIN, D.F. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. **Oecologia, Berlin**, v.131, p.515-520, 2002.
- COLETTA-FILHO, H.D. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Xylella fastidiosa* analisadas através de RAPD e VNTR**. 2002 . 88p. Tese de (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de biologia. Campinas, SP.
- COLETTA-FILHO, H.D.; BORGES, K.M.; MACHADO, M.A. Ocorrência de *Xylella fastidiosa* em plantas candidatas a matrizes de laranja doce, e transmissão por borbulhas contaminadas. **Laranja**, v.21, p.335-343, 2000.
- COLETTA FILHO, H.D., PEREIRA, E.O., SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; CRISTOFANI-YALY, M.; MACHADO, M.A. Analysis of the resistance to *Xylella fastidiosa* within a hybrid population of Pera sweet orange and Murcott tangor. **Plant Pathol**, v.56, p.661-668, 2007.
- COOTE, J.G. Structural and functional relationships among RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Rev**, v.8, n.2, p.137-161, 1992.
- CÔTÉ, F.; CHEOG, J. J.; ALBA, R.; HAHN, M. G. Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexins in soybean. **Physiol Plant**, v.93, p.401-10, 1995.
- CRISTOFANI, M.; NOVELLI, V.M.; PERIN, M.S.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, R.P.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Programa de melhoramento de citros via hibridação controlada no Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC no período de 1997 a 2005. **Laranja**, v.26, n1, p.121-134, 2005.
- CROZIER, A.; YUJI, K.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanam, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (Eds.). **Biochem Mol Biol Plants**. Rockville, Maryland: APS Press, p.850-929, 2000.
- CUI, H.; XIANG, T.; ZHOU, J-M. Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. **Cell Microbiol**, v.11, n10, p.1453-1461, 2009.
- CZECHOWSKI, T.; BARI, R.P.; STITT, M.; SCHEIBLE, W.R.; UDVARDI, M.K. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. **Plant J**, v.38, p.366-379, 2004.
- CZECHOWSKI, T.; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M.K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v.139, p.5-17, 2005.
- DA SILVA F.R.; VETTORE A.L.; KEMPER E.L.; LEITE A.; ARRUDA P. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiol Lett**, v.203, p.165-71, 2001.
- DANIEL, M. & PURKAYASTHA, R.P. **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. Marcel Dekker, New York, p.615, 1996.
- DAVIS, M.J.; PURCELL, A.H.; THOMSON, S.V. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. **Science**, v.199, p.75-77, 1978.
- DE NEGRI, J.D. **Clorose variegada dos citros: nona anomalia afetando pomares em São Paulo e Minas Gerais**. Campinas, 1990. 6p. (CATI. Comunicado Técnico, 82).
- DE PINTO, M.C.; TOMMASI, F.; DE GARA, L. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. **Plant Physiol**, v.130, p.696-708, 2002.
- DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; AMARAL, A.M.; COLETTA FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. Citrus responses to *Xylella fastidiosa* infection, the causal agent de citrus variegated chlorosis. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, v.2, n.3, p.957-964, 2009.
- DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CALDANA, C.; GOLDMAN, G.H.; YANAI, G.M.; MUTO, N.H.; COSTA DE OLIVEIRA, R.; NUNES, L.R.; MACHADO, M.A. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Mol Plant Microbe Interact**, v.16, p.867-875, 2003.
- DE SOUZA, A.A., TAKITA, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; CAMPOS, M.A.; TEIXEIRA, J.E.C.; TARGON, M.L.P.N.; CARLOS, E.F.; RAVASI, J.R.; FISCHER, C.N.; & MACHADO, M.A. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetic and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.965-971, 2007b.
- DE SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA FILHO, H.D.; TARGON, M.L.P.N.; CARLOS, E.F.; LOCALI-FABRIS, E.C.; AMARAL, A.M.; ASTUA, J.F.; SILVA-PINHATI, A.C.O.; BOSCARIOL-CAMARGO, R.L.; BERGER, I.J.; RODRIGUES, C.M.; REIS, M.S.; MACHADO, M.A. Analysis of expressed sequence tags of *Citrus sinensis* L. Osb. Infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetic and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.957-964, 2007a.
- DELKER, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; MIERSCH, O.; FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* – Enzymes, Products, Regulation. **Plant Biol**, v.8, p.297-306, 2006.

- DELLEDONNE, M. No news is good for news plants. **Curr Opin Plant Biol**, v.8, p.390-6, 2005.
- DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A.; LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, p.13454-9, 2001.
- DESAI, S.; HILI, J.; TRELOGAN, S.; DIATCHENKO, L.; SIEBERT, P.D. Identification of differentially expressed genes by suppression subtractive hybridization. In: Stephen, H.; Levesey, R. (Eds). **Functional genomics: A practical Approach**, Oxford, Univ. Press, p.45-80, 2001.
- DEYOUNG, B.J. & INNES, R.W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nat Immunol**, v.7, n.12, p.1243-1249, 2006.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y.-F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: a method for generating subtracted cDNA probes and libraries. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, p.6025-6030, 1996.
- DIXON, R.A. & PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, p.1085-97, 1995.
- DONG, X. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plant. **Curr Opin Plant Biol**, v.1, p.316-23, 1998.
- DONG, X. NPR1, all things considered. **Curr Opin Plant Biol**, v.7, p.547-52, 2004.
- DOREY, S.; COP, M.; GEOFFROY, P.; FRITIG, B.; KAUFFMANN, S. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. **Plant Physiol**, v. 121, p. 163-71, 1999.
- DOW, J.M. & DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plant. **Yeast**, v.17, n.4, p.263-271, 2000.
- DURRANT, W.E. & DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu Rev Phytopathol**, v.42, p.185-209, 2004.
- ELMOREA, J.M.; LINA, Z.-J.D.; COAKER, G. Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. **Curr Opin Plant Biol**, v.14, p.365-371, 2011.
- EMRICH, S.J. et al. Gene discovery and annotation using LCM- 454 transcriptome sequencing. **Genome res**, v.17, n.1, p.69-73, 2007.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome res**, v.8, n.3, p.175-85, 1998.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. FAOSTAT: 1962-2007. Disponível em: <<http://apps.fao.org/>>
- FEDURCO, M. et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic acids res**, v.34, n.3, p.e22, 2006.
- FIETTO, L.G.; COSTA, M.D.L.; CRUZ, C.D.; SOUZA, A.A.; MACHADO, M.A.; FONTES, E.P.B. Identification and in silico analysis of the Citrus HSP70 molecular chaperone gene family. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.881-887, 2007.
- FILICHKIN, S.A.; PRIEST, H.D.; GIVAN, S.A.; SHEN, R.; BRYANT, D.W.; FOX, S.E.; WONG, W.K.; MOCKLER, T.C. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. **Genome Res.**, v.20, p.45-58, 2010.
- FNP. **Consultoria & Comercio**. Agrarianual 2006: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2006. P. 257-270: laranja. Disponível em: < <http://www.fnp.com.br/>>
- FREITAG, J.H. Host range, of Pierce's disease virus of grape as determined by insect transmission. **Phytopathol**, v.41, p.920-934, 1951.
- FRITIG, B.; HEITZ, T.; LEGRAND, M. Antimicrobial protein in induced plant defense. **Curr Opin Immunol**, London, v.10, p.16-22, 1998.
- FRITZ-LAYLIN, L.K.; KRISHNAMURTHY, N.; TOR, M.; STJOLANDER, K.V.; JONES, J.D. Phylogeonomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v.138, p.611-23, 2005.
- JING, F.U.; HONGBO, L.; YU, L.; HUIHUI, Y.U., XIANGHUA, L.; JINGHUA, X.; SHIPING, W. Manipulating Broad-Spectrum Disease Resistance by Suppressing Pathogen-Induced Auxin Accumulation in Rice. **Plant Physiol**, v.155, p.589-602, 2011.
- GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies. **J Exp Bot**, v.55, p.1445-1454, 2004.
- GADJEV, I.; VANDERAUWERA, S.; GECHEV, T.S.; LALOI, C.; MINKOV, I.N.; VLADIMIR, S.; APEL, K., INZE, D., MITTLER, R., VAN BREUSEGEM, F. Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**, v.141, p 436-445, 2006.

- GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTA, D.; NYE, G.; et al. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, v.261, p.754-56, 1993.
- GARBALGÓN, C.; ROS-GÓMEZ, L.V.; PEDRENO, M.A.; ROS-BACELÓ, A. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. **New Phytol**, v.165, p.121-30, 2005.
- GARCIA-OLMEDO, F.; SALCEDO, G.; SANCHES-MONGE, R.; GOMEZ, L.; ROYO, J.; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and amylases. **Oxf Surv Plant Mole Cell Biol**, v.4, p.275-334, 1987.
- GCONCI. **Grupo de Consultores em Citros**, 2008. Disponível em: <<http://www.gconci.com.br/>>.
- GCONCI. **Grupo de Consultores em Citros**, 2009. Disponível em: <<http://www.gconci.com.br/>>.
- GECHEV, T.S. & HILLE, J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. **J Cell Biol**, v.168, p.17-20, 2005.
- GIANINAZZI, S.; PRATT, H.M.; SHEWRY, P.R.; MIFLIN, B.J. Partial purification and preliminary characterization of source leaf proteins specific to virus infected tobacco plants. **J Gen Virol**, v.34, p.345-51, 1977.
- GILCHRIST, D. G. Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. **Annu Rev Phytopathol**, Palo Alto, v.36, p.393-414, 1998.
- GLAZEBROOK, J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, v.43, p.205-227, 2005.
- GOHEEN, A.C.; NYLAND, G.; LOWE, S.K. Association of rickettsialike organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevine. **Phytopathol**, v.63, n.3, p.341-345, 1973.
- GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z.; WOOD, K.R. The biochemistry and physiology of plant disease. Columbia: **University of Missouri Press**, 1986. 433 p.
- GORDON, D.; ABAJIAN C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Res**, v.8, p.195-202, 1998.
- GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathogens**, Academic Press, San Diego. 1990, 342 p.
- GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Curr Opin Plant Biol**, v.9, p.414-20. 2006.
- GRAVENA, S.; DE NEGRI, J.D.; QUAGGIO, J.A. et al. Manejo de cigarrinhas e CVC em pomares de citros. In: DONATTO, L.C.; MOREIRA, C.S. **Clorose Variegada dos Citros**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura, p.91-113, 1997.
- GUILFOYLE, T.J. Auxin-regulated genes and promoters. In: P.J.J. Hooykaas, M. Hall and K.L. Libbenga (Eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones**, Elsevier, Leiden, Netherlands, p. 423-459, 1999.
- GUILHABERT, M.R. AND KIRKPATRICK, B.C. Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: hemagglutinin adhesins contribute a biofilm maturation to *X. fastidiosa* and colonization and attenuate virulence. **Mol Plant Microbe Interact**, v.18, p.856-868, 2005.
- GUO, H. & ECKER, J.R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell**, v.115, p.667-77, 2003.
- GURSKAYA, N.G.; DIATCHENKO, L.; CHENCHIK, A.; SIEBERT, P.D.; KHASPEKOV, G.L.; LUKYANOV, K, A.; VAGNER, L.L.; ERMOLAEVA, O.D.; LUKYANOV, S.; SVERDOLOV, E.D. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. **Annal Biochem**. v.240, p.90-97,1996.
- GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; GUENIN, S.; PELLOUX, J.; LEFEBVRE, J.F.; LOUVET, R.; RUSTERUCCI, C.; MORITZ, T.; GUERINEAU, F.; BELLINI, C.; VAN WUYTSWINKEL, O. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnol J**, v.6, n.6, p.609-18, 2008.
- HAGEN, G & GUILFOYLE, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. **Plant Mol Biol**, v.49, n.3-4, p.373-385, 2002.
- HAGEN, G.; MARTIN G, L.I Y.; GUILFOYLE, T.J. Auxin-induced expression of the soybean GH3 promoter in transgenic tobacco plants. **Plant Mol Biol**, v.17, p.567-579, 1991.
- HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J.P.; VAN LOON, L.C. Inducing resistance summary of papers presented at the first international symposium on induced resistance to plant diseases. Corfu, May 2000. **Eur J Plant Pathol**, Dordrecht, v.107, p.1-6, 2001.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & JONES, J.D.G. Responses to plant pathogens. In: Buchanam, B.B.; Grissem, W.; Jones, R.L. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville, Maryland: APS Press, p. 1102-56, 2000.
- HAMMOND-KOSACK, K.E. & PARKER, J.E. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Curr Opin Biotechnol**, v.14, p.177-93, 2003.

- HARTUNG, J.S.; BERETTA, J.; BRLANSKY, R.H. et al. Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathol**, v.84, p.591-597, 1994.
- HASSE, G. A laranja no Brasil 1500-1987. **Lobe Propaganda**, p.296, 1987. São Paulo: Edição de Duprat.
- HE, C.X. et al. Distribution of *Xylella fastidiosa* in citrus rootstock and transmission of citrus variegated chlorosis between sweet orange plants through natural roots grafts. **Plant Dis.**, v.84, p.622-626, 2000.
- HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cell Microbiol**, v.9, p.1385-96, 2007.
- HEARON, S.S.; SHERALD, J.L.; KOSTKA, S.J. Association of xylem-limited with elm, sycamore, and oak leaf scorch. **Can J Bot**, v.58, p.1986-1993, 1980.
- HEDRICK, S.M.; COHEN, D.I.; NIELSEN, E.A.; DAVIS, M.M.; Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane associated proteins. **Nature**, v.149, p.153, 1984.
- HEITZ, T.; GEOFFROY, P.; STINTZI, A.; FRITIG, B.; LEGRAND, M. cDNA cloning and gene expression analysis of the microbial proteinase inhibitor of tobacco. **J Biol Chem**, v.268, p.16987-92, 1993.
- HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J: qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biol**, v.8, n.2, 2007.
- HILL, B.L. & PURCELL, A.H. Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grape and four other plants. **Phytopathol**, v.85, n.11, p.1368-1372, 1995.
- HOFFLAND, E.; HAKULINEN, J.; VAN PELT, J.A. & VAN PELT, J.A. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. **Phytopathol**, v.86, p.757-762, 1996.
- HOPKINS, D.L. Physiological and pathological characteristics of virulent and avirulent strains of bacterium that causes Pierce's disease of grapevine. **Phytopathol**, v.75, p.713-717, 1985.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*. In: SINGH, U.S., SINGH, R.P., and KOHMOTO, K. (eds) Pathogenesis and host specificity in plant diseases. **Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. Vol. 1 – Prokaryotes. Elsevier Science Ltda. Great Britain. p.185-197, 1995.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa* xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annu Rev Phytopathol**, v.27, p.271-290, 1989.
- HOPKINS, D.L. & MOLLENHAVER, H.H. Rickettsialike bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, v.179, p.298-300, 1973.
- ISSAC, S. **Fungal-plant interactions**. Cambridge: Champmam and Hall, 1992. 418 p.
- JACOMINO, A.P.; MODESTO, J.C.; BERETTA, M.J.G. et al. Transmissão controlada da clorose variegada dos citros (CVC). **Fitopatol Bras**, v.18, agosto, 1993. Suplemento.
- JAIN, M.; KAUR, N.; GARG, R.; THAKUR, J.K.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J.P. Structure and expression analysis of early auxin-responsive Aux/IAA gene family in rice (*Oryza sativa*). **Funct Integr Genomics**, v.6, n.1, p.47-59, 2006.
- JAIN, M. & KHURANA, J.P. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. **FEBS J**, v.276, p.3148-62, 2009.
- JONES, D.A. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. **Curr Opin Plant Biol**, v.4, p.281-7, 2001.
- JONES, D.A.; THOMAZ, C.M.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; BALINT-KURTI, P.J.; HATZIXANTHIS, K.; JONES, J.D. Characterization of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. **Science**, v.266, p.789-93, 1994.
- KACHROO, P.; YOSHIOKA, K.; SHAH, J.; DOONER, K.D.; KLESSIG, D.F. Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. **Plant Cell**, v.12, p.677-90, 2000.
- KANT, S.; KANT, P.; RAVEH, E.; BARAK, S. Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na<sup>+</sup> uptake in *T. halophila*. **Plant Cell Environ**, v.29, p.1220-1234, 2006.
- KEEN, N. T. & YOSHIKAWA, M.  $\beta$ -1,3-Endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. **Plant Physiol**, v.71, p.460-465, 1983.
- KIN, I J.; NOH, S.J.; LEE, B.H.; JINKI, J.; KIM, Y.S.; CHUNG, W.I. Molecular characterization of cDNA clones for ADP-glucose pyrophosphorylase from *Citrus*. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.1518, p.324-328, 2001.
- KITAJIMA, E.W.; BAKARCIC, M.; FERNANDES-VALIEGA, M.V. Association of rickettsia like bacteria with plum leaf scald disease. **Phytopathol**, v.65, p.476-479, 1975.



- KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **Eur. J. Plant Pathol**, Dordrecht, v.107, n.1, p.7-12, 2001.
- KUC, J. **Increasing crop productivity and value by increasing disease resistance through non-genetic techniques**. Proceedings of a Symposium on Forest Potentials: Productivity and Value (August 20-24, 1985), Weyerhaeuser Co, Tacoma, Washington., p.147-190, 1985.
- KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plant. **Annual Review of Phytopathol**, v. 33, p. 275-297, 1995.
- KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Baccillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- KUNZE, G.U. **Characterization of a novel bacterial PAMP: elongation factor tu - and its role in *Arabidopsis thaliana* defense and immunity**. 2005. 168 p. (Ph.D. Thesis). University of Basel, Suíça.
- KUROSAKI, F., AMIN, M. & NISHI, A. Induction of Phytoalexin production and accumulation of phenolic compounds in cultured carrot cells. **Physiol Mol Plant Pathol**, v.28, p.359- 370, 1986.
- LACAVA, P.M. & MIRANDA, V.S. Utilização de provas bioquímicas na caracterização da bactéria *Xylella fastidiosa* dos citros. **Summa Phytopathol**, v.26, p.124-125, 2000.
- LAMB, C.J. & DIXON, R. The oxidative burst in plant resistance, **Ann Rev Physiol Plant Mol Biol**, v.48, p.251-75, 1997.
- LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M.; DIXON, R.A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, Cambridge, v.56, p.215-224, 1989.
- LAMBAIS, M.R.; GOLDMAN, M.H.; CAMARGO, L.E.; GOLDMAN, G.H. A genomic approach to the understanding of the *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Curr Opin Microbiol**, v.3, n.5, p.459-462, 2000.
- LARANJEIRA, F.F. **Dinâmica temporal e espacial da clorose variegada dos citros**. Piracicaba, 1997. p.150. Mestrado (Dissertação) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP, Piracicaba.
- LARANJEIRA, F.F.; HARAKAWA, R.; CARVALHO, S.A. et al. Avaliação sorológica e sintomatológica da ocorrência de *Xylella fastidiosa* e clorose variegada dos citros (CVC) no banco ativo de germoplasma do IAC. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.335, 1996. Suplemento./ Apresentado ao 29º Congresso de Fitopatologia Brasileira, Campo Grande, 1996-Resumo.
- LARANJEIRA, F.F.; POMPEU JUNIOR, J.; HARAKAWA, R. Seleção de variedades de citros tolerantes e/ou resistentes a clorose variegada dos citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.324, 1995
- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H. et al. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathol**, v.19, p.123-125, 1993.
- LEITE, B.; ISHIDA, M.L.; ALVES, E.; CARRER, H.; PASCHOAL, S.F.; KITAJIMA, E.W. Genomics and X-ray microanalysis indicate that Ca<sup>2+</sup> and thiols mediate the aggregation and adhesion of *Xylella fastidiosa*. **Braz J Med Biol Res**, v.35, n.6, p.645-650, 2002.
- LEITE, B.; RONCATO, L.D.B.; PASCHOLATI, S.F.; LAMBAIS, M.R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos fitopatogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.235-80, 1997.
- LEITE JUNIOR, R.P. & LEITE, R.M.V.B.C. Associação de *Xylella fastidiosa* com a clorose variegada dos citros. **Summa Phytopathol**, v.17, p.7, 1991.
- LEU, L.S.; SU, C.C. Isolation, cultivation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. **Plant Dis**, v.77, p.642-646, 1993.
- LI, J.; BRADER, G.; KARIOLA, T.; PALVA, E.T. WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. **Plant J**, v.46, p.477-91, 2006.
- LI, W.B.; DONADIO, L.C.; BERETTA, M.J.G. et al. Resistance or tolerance of citrus species and varieties to citrus variegated chlorosis. In: **INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS**, 1996.
- LI, W.B.; PRIA, JR, W.D.; LACAVA, P.M.; HARTUNG, J.S. Presence of *Xylella fastidiosa* in sweet orange fruit and seeds and its transmission to seedlings. **Phytopathol**, v.93, n.8, p.953-958, 2003.
- LIN, H.; DODDAPANENI, H.; TAKAHASHI, Y.; WALKER, A. M. Comparative analysis ESTs involved in grape responses to *Xylella fastidiosa* infection. **BMC Plant Biol**, v.7, n.8, p.1-13, 2007.
- LIN, Z.; ZHONG, S.; GRIERSON, D. Recent advances in ethylene. **Research Journal of Experimental Botany**, v.60, n.12, p. 3311-3336, 2009.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathol**, v.85, p.843-847, 1995a.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathol**, v.85, p.695-698, 1995b.

- LIU, L.; KLOPPER, J. W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathol**, v.85, p.1064-1068, 1995c.
- LIVAK, J.K. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LO, S.C.; WEIERGANG, I., BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiol Molr Plant Pathol**, v.49, n.1, p.21-31, 1996.
- LOPES, J.R.S. Estudos com vetores de *Xylella fastidiosa* e implicações no manejo da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.20, p.329-344, 1999.
- LOPES, J.R.S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Revista Laranja**, v.17, p.79-92, 1996.
- LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.; SOLANO, R. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathway in plant defense. **Plant Cell**, v.15, p.165-78, 2003.
- MACHADO, E.C.; QUAGGIO, J.A.; LAGÔA, A.M.M.A.; TICELLI, M.; FURLANI, P.R. Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. **R Bras Fisiol Veg**, v.6: p.53-57, 1994.
- MACHADO, M.A.; SILVÉRIO, J.L.; BAPSTISTA, C.R.; LARANJEIRA, F.F.; BERETA, J. Avaliação de transmissão e seleção de variedades à clorose variegada dos citros (CVC) (II). **Laranja**, v.14, n.2, p.167-176, 1993.
- MAOR, R.; HASKIN, S.; LEVI-KEDMI, H.; SHARON, A. In planta production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschnomene*. **Appl Environ Microbiol**, v.70, p.1852-1854, 2004.
- MARIONI, J.C. et al. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome res**, v.18, n.9, p.1509-1517, 2008.
- MARUCCI, R.C. **Eficiência de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas (Hemíptera, Cicadellidae) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *Coffe arábica* L.** Piracicaba, 2003. p.139. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, USP.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. fungal hidrolases in pea tissue. II. Inhibitor of fungal growth by combination of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. **Plant Physiol**, v.88, p. 36-42, 1988.
- MAUCH-MANI, B. & SLUSARENKO, A.J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **Plant Cel**, v.8, p.203-212, 1996.
- MCCLURE, B.A. & GUILFOYLE, T. Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. **Plant Mol Biol**, v.9, p.611-623, 1987.
- McQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D.M.; COSGROVE, D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **Plant Cell**, v.4, p.1425-1433, 1992.
- MEHDY, M.C.; SHARMA, Y.K.; SATHASIVAN, K.; BAYS, N.W. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiol Plant**, v.98, p.365-74, 1996.
- MÉTRAUX, J.P.; SIGNER, H.; RYALS, J.; WARD, E.; WYSS-BENZ, M.; et al. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. **Science**, v.250, p.1004-6, 1990.
- MIKOSCH, M.; HURDT, A.C.; HERTEL, B.; HOMANN, U. Diacid motif is required for efficient transport of the  $K^+$  channel KATI to the plasma membrane. **Plant Physiol**, v.142, p.923-30, 2006.
- MIRCETICH, S.M.; LOWE, S.K.; MOLLER, W.J. et al. Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. **Phytopathol**, v.66, p.17-24, 1976.
- MONTANS, F.M. **Inoculação e aplicação de regulador vegetal na cultura do amendoim cultivado em dois solos de diferentes texturas.** 2007. 55p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Universidade de Marília, São Paulo.
- MOREIRA, C.S. & PIO, R.M. Melhoramento de citros. In: RODRIGUEZ, O.; VIEGAS, F.; POMPEU JUNIOR.; AMARO, A.S. (Ed) **Citricultura Brasileira**. 2.en. Campinas: Fundação Cargill, 1991, v.1, p.116-152.
- MORIGUCHI, T.; KOMATSU, A.; MASAYUKI, K.; AKIMITSU, K.; ENDO-INAGAKI, T. OMURA, M. Molecular cloning of a homologue of dad-1 gene in citrus: distinctive expression during fruit development. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1490, p.198-202, 2000.
- MULLINEAX, P. & KARPINSK, S. Signal transduction in response to excess light getting out of the chloroplast. **Curr Opin Plant Biol**, v.5, p.43-8, 2002.
- MURGIA, I.; TARANTINO, D.; VANNINI, C.; BRACALE, M.; CARRAVIERI, S. SOAVE, C. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased

- resistance to paraquat-induced photooxidative stress and nitric oxide-induced cell death. **Plant J**, v.38, p.940-53, 2004.
- MUR, L.A.J.; KENTON, P.; LLOYD, A.J.; OUGHAM, H.; PRATS, E. The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? **J Exp Bot**, v.59, n. 3, p.501-520, 2008.
- MURRAY, M.G. & THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Res**, v.8, p.4321-4325, 1980.
- NAGPAL, P.; ELLIS, C.M.; WEBER, H.; PLOENSE, S.E.; BARKAWI, L.S.; *et al.* Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. **Development**, v.132, p.4107-18, 2005.
- NEILL, S.J. NO way to die – nitric oxide, programmed cell death and xylogenesis, **Physiol**, v.165, p.5-7, 2005.
- NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants, **New Physiol**, v.159, p.11-3, 2003.
- NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.; PURCELL, A.H. & LINDOW, S.E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, p.1737-1742, 2004.
- NEWMAN, K.L.; ALMEIDA, R.P.P.; PURCELL, A.H.; LINDOW, S.E. Use of a Green Fluorescent Strain for Analysis of *Xylella fastidiosa* Colonization of *Vitis vinifera*. **Appl Environ Microbiol**, p.7319-7327, 2003
- NICOT, N.; HAUSMAN, J-F.; HOFFMANN, L.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **J Exp Bot**, v. 56, p.2907-2914, 2005.
- NOVAIS, C.M. & PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Biotecnologia, Ciência & Sociedade**, v.33, p. 10-13, 2004.
- NÜRNBERGER, T.; NENNSTIEL, D.; JABS, T.; SACKS, W.R.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. **Plant Cell**, v.78, p.449-60, 1994.
- OHORI-IHARA, Y.; NAGANO, M.; MUTO, S.; UCHIMIYA, H.; KAWAIYAMADA, M. Cell death suppressor *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and iron homeostasis. **Plant Physiol**, v.143, p.650-60, 2007.
- OKU, H. **Plant pathogenesis and disease control**, Lewis Publishers, Boca Raton. 1994, 193 p.
- OLIVEIRA, A.C. **Clorose Variegada dos Citros: quantificação molecular de agente causal, avaliação de trocas gasosas de plantas infectadas e mapeamento de locos de resistência quantitativa de citros à *Xylella fastidiosa*** Wells et al. (1987) com fAFLPs. 2003. 287p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas.
- OLIVEIRA, A.C.; GARCIA, A.N.; CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. **Euphytic**, v.128, p.397-403, 2002.
- OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLSNO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells. **J Experimental Botany**, v.54, p.291-301, 2003.
- OSIRO, D.; COLNAGO, L.A.; OTOBONI, A.M.M.B.; LEMOS, E.G.M.; SOUZA, A.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; MACHADO, M.A. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.236, p. 313-318, 2004.
- OLSON, D. & VARNER, J.E. Hydrogen peroxide and lignifications. **Plant J**, v.4, p.887-92, 1993.
- O' TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol**, v.54, p.49-79, 2000.
- OUVREARD, O.; CELLIER, F.; FERRARE, K.; TOUSCH, D.; LAMAZE, T.; DUPUIS, J.M.; CASSE-DELBART, F. Identification and expression of water stress-and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. **Plant Mol Biol**, v.31, n.4, p.819-829, 1996.
- PALMER, J.E.; DIKMAN, D.A.; FUJINUMA, T.; KIM, B.; JONES, J.L.; DENDA, M.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M.; CRUZ-ALVAREZ, M. A Brassica oleracea gene expressed in a variety-specific manner may encode a novel plant transmembrane receptor. **Plant Cell Physiol** v.42, n.4, p.404-413, 2001.
- PARADELLA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil da *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.23, n.1, p.46-49, 1995.
- PARK, J.E.; PARK, J.Y.; KIM, Y.S.; STASWICK, P.E.; JEON, J.; YUN, J.; KIM, S.Y.; KIM, J.; LEE, Y.H.; PARK, C.M. GH3-mediated Auxin Homeostasis Links Growth Regulation with Stress Adaptation Response in *Arabidopsis*. **J Biol Chem**, v. 282, n. 13, p.10036-10046, 2007.

- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismo de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. Amorim L. (Ed). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronomia Ceres, 1995. V.1, Cp. 22 p. 417-454.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 2, p. 1-52, 1994.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. e CIA, P. Interação planta-patógeno. Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba, **FEALQ**, p.179-197, 2008.
- PENNINCKX, I.A.; THOMMA, B.P.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P.; BROEKAERT, W.F. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.10, p.2103-13, 1998.
- PÉREZ, R.; TUPAC-YUPANQUI, I.; DUNNER, S. Evaluation of suitable reference genes for gene expression studies in bovine muscular tissue. **BMC Mol Biol**, v.79, n.9, p.1-6, 2008.
- PFÄFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper-Excel-based tool using pairwise correlations. **Biotechnology Letter**, v.26, p.509-515, 2004.
- PIERPOINT, W.S.; ROBINSON, N.P.; LEASON, M.B. The pathogenesis-related proteins of tobacco: their induction by viruses in intact plants and their induction by chemicals in detached leaves. **Physiol Plant Pathol**, v.19, p.85-7, 1981.
- PIETERSE, C.M.J.; & VAN LOON, L.C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. **Curr Opin Plant Biol**, v.7, p.456-64, 2004.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VERHAGEN, B.W.M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K.M.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JÚNIOR, A.; RESENDE, M.L.V.; VAN LOON, L.C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para a defesa refinada. **Rundo**, v.13, p.277-295, 2005.
- POMPEU, JR.; LARANJEIRA, F.F.; HARAKAWA, R. et al. Detecção de sintomas de clorose variegada dos citros e *Xylella fastidiosa* em plantas cítricas infectadas em condições de campo. **Laranja, Cordeirópolis**, v.19, n.2, p.321-330, 1998.
- POPESCU, S.C.; POPESCU, G.V.; ZHANG, Z.; SEAY, M.S.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M.; DINESH-KUMAR, S.P. Differential bindings of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* proteins microarrays. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, p.4730-5, 2007.
- POSTEIN, A.S.; BRES VLOEMANS, S.A.; SELA BUURLAGE, M.B.; ELZEN, P.J.M.V.D.; MELCHERS, L.S.; CORNELISSEN, B.J.C.; VAN DEN ELZEN, P.J.M. A novel pathogen and wound-inducible tobacco protein with antifungal activity. **Plant Physiol**, v.104, p.109-18, 1994.
- POTUSCHAK, T.; LECHNER, E.; PARMENTIER, Y.; YANAGISAWA, S.; GRAVA, S. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. **Cell**, v.115, p.679-89, 2003.
- PRIGGE, M.J.; LAVY, M.; ASHTON, N.W.; ESTELLE, M. *Physcomitrella patens* Auxin-Resistant Mutants Affect Conserved Elements of an Auxin-Signaling Pathway. **Curr Biol**, v.20, p.1907-1912, 2010.
- PURCELL, A.H. Cigarrinhas na cultura de citros. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE CITROS, 3., Bebedouro, 1994. **Anais**. Campinas: Fundação Cargill, 1994. p.195-209.
- PURCELL, A.H. & FINALAY, A.H. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. **Phytopathol**, v.69, n.4, p.393-395, 1979.
- PURCELL, A.H. & HOPKINS D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, v.34, p.131-151, 1996.
- PURCELL, A.H. & SAUNDERS, S.R. Fate of Pierce's disease strain of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. **Plant Dis.**, v.83, p.825-830, 1999.
- OUELLET, F.; OVERVOORDE, P.J.; THEOLOGIS, A. IAA17/AXR3. Biochemical insight into an auxin mutant phenotype. **Plant Cell**, v.13, p.829-842, 2001.
- QUIRINO, B.F. & BENT, A.F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the *Arabidopsis/Pseudomonas* interaction as a model. **Mol Plant Pathol**, v.4, n.6, p.517-530, 2003.
- RAJU, B.C. & WELLS, J.M. Diseases caused by fastidious xylem-limited bacteria. **Plant Dis**, v.70, n.3, p.182-186, 1986.
- RAMÍREZ, V.; VAN DER ENT, S.; GARCÍA-ANDRADE, J.; COEGO, A.; PIETERSE, C.M.J.; VERA, P. OCP3 is an important modulator of NPR1-mediated jasmonic acid-dependent induced defenses in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biol**, v.10, n.199, p.1-13, 2010.
- REBOUÇAS, N. A.; GOMES, M. D. Hibridação subtrativa seguida de PCR – uma abordagem para identificação de genes funcionalmente relacionados com fenótipos celulares específicos. **Biociência e desenvolvimento**, v.11, p.30-35, 1999.

- REED, J.W. Roles and activities of Aux/IAA proteins in *Arabidopsis*. **Trends Plant Sci**, v.6, n.9, p.420-425, 2001.
- REINEKE, G.; HEINZE, B.; SCHIRAWSKI, J.; BUETTNER, H.; KAHMANN, R.; BASSE, C.W. Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. **Mol Plant Pathol**, v.9, p.339-355, 2008.
- RESENDE, L.V.; BARRETTI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D.; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos, **RAPP**, v.15, p.129-198, 2007.
- RIBEIRO, M.P.M.A. **Resistência a antibióticos, variabilidade genética e perfil protéico da *Xylella fastidiosa***. 2002. p.130. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP, Piracicaba.
- ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O; MIRANDA, V.S.; CARLOS, E.F. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminales* e *Oncometopia faciales* em citros. **Fitopatol Bras**, v.21, p.517-518, 1996.
- ROBERT-SEILANIANTZ, A.; GRANT, M.; JONES, J.D.G. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATESALICYLATE Antagonism. **Annu Rev Phytopathol**, v.49, p.317-43, 2011.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas**. Editora UFV, Viçosa. p.367, 1995.
- ROMEIRO, R. S. **Bioquímica da Interação Bactéria – Planta**. Editora UFV, Viçosa, p.37, 1985.
- ROMEIRO, R. S. **Fundamentos de Fisiologia do Parasitismo em Fitopatologia**. Editora UFV, Viçosa, p.31, 1987.
- ROMERO-PUERTAS, M.C.; PERAZZOLLI, M.; ZAGO, E.; DELLEDONNE, M. Nitric oxide signaling functions in plant pathogen interaction, **Cell Microbiol**, v.6, p.795-803, 2004.
- ROSSETTI, V.; CARVALHO, M.L.V.; CHAGAS, C.M. Ensaios de transmissão de clorose variegada dos citros (CVC) em campo. **Fitopatol Bras**, v.20, p.351, 1995.
- ROSSETTI, V. & DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos Citros: **revisão Laranja**, Cordeirópolis, v.11, n.1, p.1-14, 1990.
- ROSSETTI, V.; GARNIER, M.; BOVÉ, J.M. et al. Présence de bactéries dans lê xylème d'orange atteints de chlorose variégée, une nouvelle maladie des agrumes au Brésil. **C R Hebd Seances Acad Sci.**, v.310, p.345-349, 1990.
- SANDERLIN, R.S. & HEYDERICH-ALGER, K.I. Evidence that *Xylella fastidiosa* can cause leaf scorch disease of pecan. **Plant Dis.**, v.84, n.12, p.1282-1286, 2000.
- SAROWAR, S.; OH, H.W.; CHO, H.S.; et al. *Capsicum annuum* CCR4- associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. **Plant J**, v.51, p.792-802, 2007.
- SCHAAD, N.W. et al. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. **Syst. Appl. Microbiol**, v.27, p.290-300, 2004.
- SCHLUMBAUM, A.; MAUCH, F.; VOGEL, U.; BOLLER, T. Plant chitinases are a potent inhibitor of fungal growth. **Nature**, v.324, p.365-7, 1986.
- SCHMITTGEN, T.D. & ZAKRAJSEK, B.A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real time quantitative RT-PCR. **J Biochem Biophys Methods**, v.46, p.69-81, 2000.
- SECEX. Secretaria de Comércio Exterior, 2008. Disponível em: <http://www2.desenvolvimento.gov.br/sitio/secex.php>
- SHEN, Q.H.; SAIJO, Y.; MAUCH, S.; BISKUP, C.; BIERI, S.; KELLER, B.; SEKI, H.; ULKER, B.; SOMSSICH, I.E.; SCHULZE-LEFERT, P. Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease resistance responses. **Science**, v.315, p.1098-1103, 2007.
- SHENDURE, J. & JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nat biotechnology**, v.26, n.10, p.1135-1145, 2008.
- SILVA, C.L.S.P. **Apomixia em citros: expressão diferencial de mRNA e proteínas em plântulas e embriões zigóticos e apomíticos** (Tese de doutorado em Agronomia). Faculdade de ciências agrárias e veterinárias. Universidade Estadual Paulista, 2002, 110p.
- SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C.; ARRUDA P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.40, p.151-159, 2000.
- SMITH, C.J. Accumulation of Phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, n.1, p.1-45, 1996.
- STAHL, E. A.; BISHOP, J. G. Plant-pathogen arms races at the molecular level. **Curr Opin Plant Biol**, Cambridge, v.3, n.4, p.299-304, 2000.
- STASWICK, P.E. & TIRYAKI, I. The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.16, p.2117-2127, 2004.

- STASWICK, P.E.; TIRYAKI, I.; ROWE, M.L. Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. **Plant Cell**, v.14, p.1405-1415, 2002.
- STASWICK, P.E.; YUEN, G.Y.; LEHMAN, C.C. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **Plant J**, v.15, p.747-754, 1998.
- STEPANOVA, A.N.; YUN, J.; LIKHACHEVA, A.V.; ALONSO, J.M. Multilevel Interactions between Ethylene and Auxin in *Arabidopsis* Roots. **The Plant Cell**, v.19, p.2169-2185, 2007.
- STICHER, L.; MAUCH MANI, B. & METRAÚX, J. P. Systemic acquired resistance. **Ann Rev Phytopathol**, v.35, p.235- 270, 1997.
- STUART, R.M. *Citrus spp. X Alternaria alternata patótipo tangerina: análise da interação planta-patógeno*. 2011. Tese de (doutorado). Universidade Estadual de Campinas. Instituto de biologia. Campinas, SP.
- SZCZEGIELNIAK, J.; KLIMECKA, M.; LIOWOSZ, A.; CIESILSKI, A.; KACZANOWSKI, S.; DOBROWLSKA, G.; HARMON, A.C.; MUSZYNKA, C. A wound-reponsive and phospholipid-regulated maize calcium dependent protein kinase. **Plant Physiology**, v.139, p.1970-83, 2005.
- TABATA, R.; IKEZAKI, M.; FUJIBE, T.; AINDA, M.; TIAN, C.E.; *et al.* *Arabidopsis* auxin response factor 6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. **Plant Cell Physiol**, v.51, p.164-75, 2010.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. Plant Physiology. 2<sup>nd</sup> ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1998, 792p.
- TANG, F. *et al.* mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. **Nat Methods**, v.6, p.377-382, 2009.
- THOMMA, B.P.; PENNINGCKX, I.A.; BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P. The complexity of disease signaling in Arabidopsis. **Curr Opin Immunol**, v.13, p.63-68, 2001.
- TOMIYAMA, K. Physiology and biochemistry of disease resistance of plants. **Ann. Rev. Phytopath**, v.1, p. 295-324, 1963.
- TOR, M.; LOTZE, M.T.; HOLTON, N. Receptor-mediated signaling in plants: molecular patterns and programmes. **J Exp Bot**, v. 60, n. 13, p3645-3654, 2009.
- TORRES, M.A. ROS in biotic interactions. **Physiol Plant**, v.138, p.414-429, 2010.
- TRAPNELL, C.; PACHTER, L. & SALZBERG, S.L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinforma**, v. 25, n.9, p.1105-1111, 2009.
- TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B.A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M.J.; SALZBERG, S.L.; WOLD, B.J. & PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nat Biotechnol**, v.28, n.5, p.511-518, 2010.
- TREWAVAS, A. Signal perception and transduction. In: Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, Marland: APS Press. P.930-87.
- TRUMAN, W.; BENNETT, M.H.; KUBISTELTIG, I.; TURNBULL, C.; GRANT, M. *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, p.1075-80, 2007.
- TURCATTI, G. *et al.* A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Res**, v.36, e25, 2008.
- ULMASOV, T.; HAGEN, G.; GUILFOYLE, T.J. ARF1, a transcription factor that binds auxin response elements. **Science**, v.276, p.1865-1868, 1997.
- VANDESOMPELE, J.; DE PRETTER, K.; PATTYN, F. POPPE, B.; ROY, N. V.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v.3, n.7, 2002.
- VAN LOON, L.C., REP, M. & PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Ann Rev Phytopathol**, v.44, p.135-162, 2006.
- VAN LOON, L.C. & VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". **Virol**, v.40, p.199-211, 1970.
- VAN LOON, L.C. & VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol. Mol Plant Pathol**, v.55, p.85-97, 1999.
- VIGERS, A.J.; WIEDERMANN, S.; ROBERST, W.K.; LEGRAND, M.; SELITRENNIKOFF, C.P.A.; FRITIG, B. Thaumatin like pathogenesis-related proteins are antifungal. **Plant Sci**, v.83, p.155-61, 1992.
- VIJAYAN, P.; SHOCKEY, J.; LÉVESQUE, A.; COOK, R.J.; BROWSE, J. A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p.7209-7214, 1998.

- VOGELI, U. & CHAPPELL, J. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. **Plant Physiol**, v.88, p.12291-6, 1988.
- VOIBLET, C; DUPLESSIS, S; ENCELOT, N; MARTIN, F. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. **Plant J.**, v.25, n.2, p.181-91, 2001.
- VOLKOV, R.A.; PANCHUK, I.I.; SCHOFFL, F. Heat stress dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of housekeeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real time RT-PCR. **J Exp Bot**, v.54, p.2343-2349, 2003.
- XIONG, L; LEE, M.W; QI M; YANG Y. Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. **Mol Plant Microbe Interact**, v.14, n.5, p.685-92, 2001.
- WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopatol**, Saint Paul, v.95, n.12, p.1368-1373, 2005.
- WANG, D.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; CULLER, A.H.; DONG, X. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. **Curr Biol**, v.17, p.1784-90, 2007.
- WANG, J. & HIGGINS, V.J. Nitric oxide modulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated defenses in the *Colletotrichum coccodes* tomato interaction. **Physiol Mol Plant Pathol**, v.67, p.131-7, 2006.
- WANG, Z. *et al.* RNA-seq: A revolutionary tool for transcriptomics. **Nature**, v.10, p.57-63, 2009.
- WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Ann Bot London**, p.1-17, 2007.
- WEEBER, H.J.; REUTHER, W.; LAWTON, H. W. History and development of the citrus industry. In: REUTHER, W. WEBBER, H.J.; BATCHELOR, L.D. (Ed.). **The citrus industry**. Riverside: University of California, v.1, p.1-39, 1967.
- WELLS, H.J.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y. *Xylella fastidiosa*: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* ssp. **Int J Syst Bacteriol**, v.37, p.136-143, 1987.
- WHALEN, M. C. Host defense in a developmental context. **Mol Plant Pathol**, Beltsville, v.6, n.3, p.347-360, 2005.
- WIEMER, M.; FEYS, B.J.; PARKER, J.E. Plant immunity: the EDS1 regulatory node. **Curr Opin Plant Biol**, v.8, p.383-389, 2005.
- WILDERMUTH, M.C. Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. **Curr Opin Plant Biol**, v.9, p.288-96, 2006.
- WILKOSZ, R.; SCHALÄPPI, M. A gene expression screen identifies EARLI1 as a novel vernalization-responsive gene in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol**, v.44, p.777-787, 2000.
- WONG, M.L. & MEDRANO, J.F. Real-time for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v.39, n.1, 2005.
- WOODWARD, A.W. & BONNIE, B. Auxin: Regulation, Action, and Interaction. **Annals of Botany**, v.95, p.707-735, 2005.
- YANG, T. & POOVAIAH, B.W. Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action. **J Biol Chem**, v.275, p.3137-3143, 2000.
- YOSHIKAWA, M.; TSUDA, M.; TAKEUCHI, Y. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor,  $\beta$ -1,3-glucanase, from soybean. **Naturwiss**, v.80, p.417-420, 1993.
- YANG, S.; ZHANG, Q.; GUO, J.; CHARKOWSKI, A.O.; GLICK, B.R.; IBEKWE, A.M.; COOKSEY, D.A.; YANG, C.H. Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Appl Environ Microbiol**, v.73, p.1079-1088, 2007.
- ZHANG, J. & ZHOU, J-M. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. **Mol Plant**, v.3, n.5, p.783-793, 2010.

# **ANEXO**



**Tabela S1 .** Genes induzidos e reprimidos em plantas de tangerina poncan em resposta a *X. fastidiosa*

Genes induzidos				
<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1204056	1.00217	clementine0.9_028021m PACid:19281754	AT5G59990.1	CCT motif family protein
NGS-CR-1237886	1.00442	clementine0.9_001329m PACid:19268133	AT1G45616.1	receptor like protein 6
NGS-CR-1220980	1.00482	clementine0.9_012703m PACid:19271790	AT1G68010.1	hydroxypyruvate reductase
NGS-CR-1222185	1.00544	clementine0.9_021771m PACid:19274412	AT3G14200.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
NGS-CR-1222959	1.00574	clementine0.9_006330m PACid:19277125	AT4G24010.1	cellulose synthase like G1
NGS-CR-1282942	1.00587	clementine0.9_012637m PACid:19254154	AT4G08300.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
NGS-CR-1203148	1.0072	clementine0.9_020373m PACid:19273095		
NGS-CR-1245901	1.00722	clementine0.9_030021m PACid:19276742	AT5G14740.2	carbonic anhydrase 2
NGS-CR-1239665	1.00893	clementine0.9_029473m PACid:19254804	AT3G18660.1	plant glycogenin-like starch initiation protein 1
NGS-CR-1227938	1.0103	clementine0.9_027815m PACid:19269479	AT5G06970.1	Protein of unknown function (DUF810)
NGS-CR-1251657	1.01109	clementine0.9_011681m PACid:19268870	AT5G38450.1	cytochrome P450, family 735, subfamily A, polypeptide 1
NGS-CR-1265489	1.01109	clementine0.9_022917m PACid:19262613	AT3G23760.1	
NGS-CR-1201398	1.01175	clementine0.9_017291m PACid:19276873	AT4G17040.1	CLP protease R subunit 4
NGS-CR-1204971	1.01303	clementine0.9_005835m PACid:19284199	AT2G40460.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1214360	1.01304	clementine0.9_002714m PACid:19269902	AT1G45160.2	Protein kinase superfamily protein
NGS-CR-1243643	1.01428	clementine0.9_005568m PACid:19276669	AT3G62270.1	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> transporter family
NGS-CR-1221368	1.01554	clementine0.9_022142m PACid:19277854	AT4G10250.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1207933	1.01729	clementine0.9_000479m PACid:19254209	AT4G26090.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1216300	1.01887	clementine0.9_008346m PACid:19282809	AT2G36800.1	don-glucosyltransferase 1
NGS-CR-1272309	1.01887	clementine0.9_010995m PACid:19268015	AT2G24280.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
NGS-CR-1224197	1.01887	clementine0.9_014967m PACid:19286474	AT4G39150.1	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
NGS-CR-1212642	1.02503	clementine0.9_016631m PACid:19275811	AT5G24090.1	chitinase A
NGS-CR-1209840	1.02679	clementine0.9_025671m PACid:19276033	AT2G37870.1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albu
NGS-CR-1200666	1.02745	clementine0.9_000048m PACid:19253160	AT1G36160.1	acetyl-CoA carboxylase 1
NGS-CR-1237886	1.02755	clementine0.9_036038m PACid:19268134	AT4G13810.1	receptor like protein 47
NGS-CR-1257451	1.03027	clementine0.9_004457m PACid:19278481	AT4G27290.1	S-locus lectin protein kinase family protein
NGS-CR-1208116	1.03056	clementine0.9_028622m PACid:19265538	AT5G44640.1	beta glucosidase 13
NGS-CR-1226169	1.03187	clementine0.9_009378m PACid:19265423	AT1G59740.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1203699	1.03447	clementine0.9_000910m PACid:19285633	AT5G06600.1	ubiquitin-specific protease 12
NGS-CR-1239921	1.03794	clementine0.9_010674m PACid:19253377	AT5G46410.2	SCP1-like small phosphatase 4

Tabela S1. Parte 2

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1212413	1.03831	clementine0.9_033890m PACid:19266675	AT3G52600.1	cell wall invertase 2
NGS-CR-1219687	1.03864	clementine0.9_009067m PACid:19251531	AT4G37930.1	serine transhydroxymethyltransferase 1
NGS-CR-1202829	1.04675	clementine0.9_035900m PACid:19277891	AT1G33440.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1202371	1.05314	clementine0.9_003850m PACid:19275238	AT5G52640.1	heat shock protein 90.1
NGS-CR-1278805	1.05316	clementine0.9_026298m PACid:19255203		
NGS-CR-1211965	1.05408	clementine0.9_034583m PACid:19255882	AT5G14750.1	myb domain protein 66
NGS-CR-1217721	1.05476	clementine0.9_020557m PACid:19264255	AT2G46300.1	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glyco
NGS-CR-1221563	1.05611	clementine0.9_035827m PACid:19265934	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1257131	1.05655	clementine0.9_001911m PACid:19278739	AT5G63020.1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
NGS-CR-1224275	1.05655	clementine0.9_007115m PACid:19260362	AT3G17040.1	high chlorophyll fluorescent 107
NGS-CR-1241954	1.05988	clementine0.9_008118m PACid:19281697	AT4G05160.1	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
NGS-CR-1251657	1.0607	clementine0.9_011681m PACid:19268870	AT5G38450.1	cytochrome P450, family 735, subfamily A, polypeptide 1
NGS-CR-1226122	1.06119	clementine0.9_005423m PACid:19255938	AT5G12220.1	las1-like family protein
NGS-CR-1207512	1.0645	clementine0.9_010102m PACid:19253584	AT3G06350.1	dehydroquinase dehydratase, putative / shikimate dehydrogenase
NGS-CR-1234504	1.06484	clementine0.9_024569m PACid:19282592	AT1G07400.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1227966	1.06772	clementine0.9_001094m PACid:19273266	AT4G33010.1	glycine decarboxylase P-protein 1
NGS-CR-1210438	1.06941	clementine0.9_003340m PACid:19271299	AT4G16370.1	oligopeptide transporter
NGS-CR-1205414	1.07127	clementine0.9_004589m PACid:19282345	AT3G12580.1	heat shock protein 70
NGS-CR-1222641	1.07305	clementine0.9_018486m PACid:19258408	AT3G29270.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1220960	1.07361	clementine0.9_029725m PACid:19285158	AT5G42940.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1235215	1.07554	clementine0.9_008386m PACid:19258990	AT1G27920.1	microtubule-associated protein 65-8
NGS-CR-1238442	1.08058	clementine0.9_008506m PACid:19268391	AT3G14690.1	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 15
NGS-CR-1265631	1.08887	clementine0.9_019377m PACid:19275642	AT3G12890.1	activator of spomin::LUC2
NGS-CR-1225678	1.0906	clementine0.9_010338m PACid:19270017	AT1G22100.1	Inositol-pentakisphosphate 2-kinase family protein
NGS-CR-1241685	1.09061	clementine0.9_001540m PACid:19265580	AT1G55550.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamil
NGS-CR-1224389	1.09315	clementine0.9_000003m PACid:19259041	AT5G23110.1	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger) family protein
NGS-CR-1247769	1.09315	clementine0.9_008511m PACid:19266837	AT1G12370.2	photolyase 1
NGS-CR-1263967	1.0981	clementine0.9_000160m PACid:19279164	AT1G06490.1	glucan synthase-like 7
NGS-CR-1257440	1.10184	clementine0.9_000449m PACid:19256622	AT4G27190.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1220601	1.10291	clementine0.9_025134m PACid:19286088	AT4G21870.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1226013	1.1043	clementine0.9_008293m PACid:19271798	AT1G47670.1	Transmembrane amino acid transporter family protein
NGS-CR-1225268	1.10433	clementine0.9_004505m PACid:19273327	AT1G16030.1	heat shock protein 70B
NGS-CR-1225268	1.10606	clementine0.9_002012m PACid:19254798	AT3G18640.1	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein

Tabela S1. Parte 2

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	*Arabidopsis code	**Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1212413	1.03831	clementine0.9_033890m PACid:19266675	AT3G52600.1	cell wall invertase 2
NGS-CR-1219687	1.03864	clementine0.9_009067m PACid:19251531	AT4G37930.1	serine transhydroxymethyltransferase 1
NGS-CR-1202829	1.04675	clementine0.9_035900m PACid:19277891	AT1G33440.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1202371	1.05314	clementine0.9_003850m PACid:19275238	AT5G52640.1	heat shock protein 90.1
NGS-CR-1278805	1.05316	clementine0.9_026298m PACid:19255203		
NGS-CR-1211965	1.05408	clementine0.9_034583m PACid:19255882	AT5G14750.1	myb domain protein 66
NGS-CR-1217721	1.05476	clementine0.9_020557m PACid:19264255	AT2G46300.1	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein
NGS-CR-1221563	1.05611	clementine0.9_035827m PACid:19265934	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1257131	1.05655	clementine0.9_001911m PACid:19278739	AT5G63020.1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
NGS-CR-1224275	1.05655	clementine0.9_007115m PACid:19260362	AT3G17040.1	high chlorophyll fluorescent 107
NGS-CR-1241954	1.05988	clementine0.9_008118m PACid:19281697	AT4G05160.1	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
NGS-CR-1251657	1.0607	clementine0.9_011681m PACid:19268870	AT5G38450.1	cytochrome P450, family 735, subfamily A, polypeptide 1
NGS-CR-1226122	1.06119	clementine0.9_005423m PACid:19255938	AT5G12220.1	las1-like family protein
NGS-CR-1207512	1.0645	clementine0.9_010102m PACid:19253584	AT3G06350.1	dehydroquinase dehydratase, putative / shikimate dehydrogenase
NGS-CR-1234504	1.06484	clementine0.9_024569m PACid:19282592	AT1G07400.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1227966	1.06772	clementine0.9_001094m PACid:19273266	AT4G33010.1	glycine decarboxylase P-protein 1
NGS-CR-1210438	1.06941	clementine0.9_003340m PACid:19271299	AT4G16370.1	oligopeptide transporter
NGS-CR-1205414	1.07127	clementine0.9_004589m PACid:19282345	AT3G12580.1	heat shock protein 70
NGS-CR-1222641	1.07305	clementine0.9_018486m PACid:19258408	AT3G29270.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1220960	1.07361	clementine0.9_029725m PACid:19285158	AT5G42940.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1235215	1.07554	clementine0.9_008386m PACid:19258990	AT1G27920.1	microtubule-associated protein 65-8
NGS-CR-1238442	1.08058	clementine0.9_008506m PACid:19268391	AT3G14690.1	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 15
NGS-CR-1265631	1.08887	clementine0.9_019377m PACid:19275642	AT3G12890.1	activator of spomin::LUC2
NGS-CR-1225678	1.0906	clementine0.9_010338m PACid:19270017	AT1G22100.1	Inositol-pentakisphosphate 2-kinase family protein
NGS-CR-1241685	1.09061	clementine0.9_001540m PACid:19265580	AT1G55550.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily
NGS-CR-1224389	1.09315	clementine0.9_000003m PACid:19259041	AT5G23110.1	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger) family protein
NGS-CR-1247769	1.09315	clementine0.9_008511m PACid:19266837	AT1G12370.2	photolyase 1
NGS-CR-1263967	1.0981	clementine0.9_000160m PACid:19279164	AT1G06490.1	glucan synthase-like 7
NGS-CR-1257440	1.10184	clementine0.9_000449m PACid:19256622	AT4G27190.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1220601	1.10291	clementine0.9_025134m PACid:19286088	AT4G21870.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1226013	1.1043	clementine0.9_008293m PACid:19271798	AT1G47670.1	Transmembrane amino acid transporter family protein
NGS-CR-1225268	1.10433	clementine0.9_004505m PACid:19273327	AT1G16030.1	heat shock protein 70B
NGS-CR-1225268	1.10606	clementine0.9_002012m PACid:19254798	AT3G18640.1	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein

Tabela S1. Parte 3

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1221742	1.10735	clementine0.9_029992m PACid:19261665	AT1G20925.1	Auxin efflux carrier family protein
NGS-CR-1210650	1.10934	clementine0.9_024268m PACid:19281920	AT1G53540.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1245087	1.11206	clementine0.9_035360m PACid:19269609	AT4G27190.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1230386	1.11264	clementine0.9_024233m PACid:19282101	AT1G53540.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1214531	1.11127	clementine0.9_000548m PACid:19264862	AT4G00230.1	xylem serine peptidase 1
NGS-CR-1218823	1.11197	clementine0.9_026969m PACid:19256943	AT5G53486.2	
NGS-CR-1231000	1.1219	clementine0.9_001309m PACid:19273500	AT2G26910.1	pleiotropic drug resistance 4
NGS-CR-1232653	1.12383	clementine0.9_022941m PACid:19262938	AT5G57560.1	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family protein
NGS-CR-1204923	1.12398	clementine0.9_010975m PACid:19268608	AT5G38200.1	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
NGS-CR-1204923	1.12887	clementine0.9_000624m PACid:19258328	AT3G28345.1	ABC transporter family protein
NGS-CR-1210443	1.13274	clementine0.9_017282m PACid:19277063	AT5G26040.2	histone deacetylase 2
NGS-CR-1270688	1.13295	clementine0.9_027120m PACid:19279203		
NGS-CR-1222591	1.13423	clementine0.9_013869m PACid:19252964	AT3G12750.1	zinc transporter 1 precursor
NGS-CR-1211719	1.13488	clementine0.9_020732m PACid:19284998	AT2G17820.1	histidine kinase 1
NGS-CR-1208116	1.13603	clementine0.9_028622m PACid:19265538	AT5G44640.1	beta glucosidase 13
NGS-CR-1203265	1.13776	clementine0.9_002337m PACid:19282247	AT3G46970.1	alpha-glucan phosphorylase 2
NGS-CR-1212521	1.13893	clementine0.9_014233m PACid:19277515	AT4G10050.1	esterase/lipase/thioesterase family protein
NGS-CR-1283031	1.14013	clementine0.9_029162m PACid:19270510		
NGS-CR-1256788	1.14421	clementine0.9_031343m PACid:19258250	AT1G49570.1	Peroxidase superfamily protein
NGS-CR-1256788	1.14462	clementine0.9_000328m PACid:19262622	AT3G13080.1	multidrug resistance-associated protein 3
NGS-CR-1256788	1.14582	clementine0.9_012816m PACid:19252837	AT1G30840.1	purine permease 4
NGS-CR-1220725	1.14589	clementine0.9_010750m PACid:19253319	AT1G08820.1	vamp/synaptobrevin-associated protein 27-2
NGS-CR-1220014	1.14722	clementine0.9_002902m PACid:19263818	AT4G13420.1	high affinity K <sup>+</sup> transporter 5
NGS-CR-1204056	1.14831	clementine0.9_028021m PACid:19281754	AT5G59990.1	CCT motif family protein
NGS-CR-1230650	1.14945	clementine0.9_007672m PACid:19257582	AT3G54700.1	phosphate transporter 1;7
NGS-CR-1215682	1.15117	clementine0.9_018592m PACid:19287089	AT4G24380.1	
NGS-CR-1220398	1.1524	clementine0.9_000055m PACid:19285760	AT1G08260.1	DNA polymerase epsilon catalytic subunit
NGS-CR-1220398	1.1524	clementine0.9_000871m PACid:19271097	AT4G18130.1	phytochrome E
NGS-CR-1225372	1.15274	clementine0.9_028045m PACid:19265696	AT1G55210.1	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family prote
NGS-CR-1214552	1.15575	clementine0.9_001117m PACid:19263864	AT5G44030.1	cellulose synthase A4
NGS-CR-1206595	1.16286	clementine0.9_002119m PACid:19276671	AT5G41580.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1229215	1.16424	clementine0.9_024050m PACid:19282137	AT1G07400.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1211062	1.17115	clementine0.9_001439m PACid:19271783	AT5G58140.1	phototropin 2

Tabela S1. Parte 4

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1211062	1.17361	clementine0.9_016694m PACid:19283063	AT4G27030.1	fatty acid desaturase A
NGS-CR-1237209	1.17467	clementine0.9_000247m PACid:19271796	AT4G38440.1	
NGS-CR-1221742	1.17506	clementine0.9_029992m PACid:19261665	AT1G20925.1	Auxin efflux carrier family protein
NGS-CR-1252518	1.17689	clementine0.9_033276m PACid:19264014	AT1G03055.1	
NGS-CR-1211062	1.1783	clementine0.9_001439m PACid:19271783	AT5G58140.1	phototropin 2
NGS-CR-1243557	1.17838	clementine0.9_029190m PACid:19253344	AT1G56500.1	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
NGS-CR-1211585	1.17857	clementine0.9_006017m PACid:19266590	AT3G08970.1	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
NGS-CR-1222520	1.1872	clementine0.9_001188m PACid:19261151	AT3G16785.1	phospholipase D P1
NGS-CR-1200222	1.18804	clementine0.9_010130m PACid:19268025	AT1G12110.1	nitrate transporter 1.1
NGS-CR-1221512	1.18981	clementine0.9_004845m PACid:19279735	AT5G19600.1	sulfate transporter 3;5
NGS-CR-1218823	1.19153	clementine0.9_026969m PACid:19256943	AT5G53486.2	
NGS-CR-1215951	1.19229	clementine0.9_034759m PACid:19268195	AT1G45616.1	receptor like protein 6
NGS-CR-1237886	1.20144	clementine0.9_027461m PACid:19268193	AT1G71400.1	receptor like protein 12
NGS-CR-1205691	1.20492	clementine0.9_017280m PACid:19252668	AT1G49470.1	Family of unknown function (DUF716)
NGS-CR-1216561	1.20826	clementine0.9_002381m PACid:19275635	AT5G51430.1	conserved oligomeric Golgi complex component-related / COG c
NGS-CR-1219428	1.20885	clementine0.9_031173m PACid:19270206	AT1G75130.1	cytochrome P450, family 721, subfamily A, polypeptide 1
NGS-CR-1207842	1.21262	clementine0.9_030834m PACid:19275711	AT4G25610.1	C2H2-like zinc finger protein
NGS-CR-1216561	1.21529	clementine0.9_002381m PACid:19275635	AT5G51430.1	conserved oligomeric Golgi complex component-related / COG c
NGS-CR-1204115	1.21743	clementine0.9_021052m PACid:19272966	AT3G43660.1	Vacuolar iron transporter (VIT) family protein
NGS-CR-1201403	1.21951	clementine0.9_001850m PACid:19278112	AT2G16640.1	multimeric translocon complex in the outer envelope membrane
NGS-CR-1202145	1.21987	clementine0.9_001319m PACid:19263184	AT4G30110.1	heavy metal atpase 2
NGS-CR-1211322	1.22183	clementine0.9_014162m PACid:19253021	AT1G17020.1	senescence-related gene 1
NGS-CR-1245677	1.2244	clementine0.9_004166m PACid:19258506	AT5G15250.1	FTSH protease 6
NGS-CR-1216862	1.22823	clementine0.9_001348m PACid:19258410	AT3G29320.1	Glycosyl transferase, family 35
NGS-CR-1247162	1.22955	clementine0.9_023420m PACid:19285502	AT1G65480.1	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein
NGS-CR-1204582	1.23024	clementine0.9_000011m PACid:19260377	AT2G28290.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamil
NGS-CR-1231338	1.23158	clementine0.9_011727m PACid:19278601	AT5G17520.1	root cap 1 (RCP1)
NGS-CR-1270729	1.23289	clementine0.9_027875m PACid:19282698	AT3G14470.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1226452	1.23333	clementine0.9_003915m PACid:19276506	AT1G74790.1	catalytics
NGS-CR-1279503	1.24146	clementine0.9_024419m PACid:19269040		
NGS-CR-1281912	1.2447	clementine0.9_004603m PACid:19260210	AT3G12580.1	heat shock protein 70
NGS-CR-1210007	1.2454	clementine0.9_003185m PACid:19259360	AT1G69830.1	alpha-amylase-like 3
NGS-CR-1247763	1.24665	clementine0.9_016097m PACid:19253769	AT1G56430.1	nicotianamine synthase 4

Tabela S1. Parte 5

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1212413	1.03831	clementine0.9_033890m PACid:19266675	AT3G52600.1	cell wall invertase 2
NGS-CR-1219687	1.03864	clementine0.9_009067m PACid:19251531	AT4G37930.1	serine transhydroxymethyltransferase 1
NGS-CR-1202829	1.04675	clementine0.9_035900m PACid:19277891	AT1G33440.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1202371	1.05314	clementine0.9_003850m PACid:19275238	AT5G52640.1	heat shock protein 90.1
NGS-CR-1278805	1.05316	clementine0.9_026298m PACid:19255203		
NGS-CR-1211965	1.05408	clementine0.9_034583m PACid:19255882	AT5G14750.1	myb domain protein 66
NGS-CR-1217721	1.05476	clementine0.9_020557m PACid:19264255	AT2G46300.1	Late embryogenesis abundant (LEA) hydroxyproline-rich glycoprotein
NGS-CR-1221563	1.05611	clementine0.9_035827m PACid:19265934	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1257131	1.05655	clementine0.9_001911m PACid:19278739	AT5G63020.1	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
NGS-CR-1224275	1.05655	clementine0.9_007115m PACid:19260362	AT3G17040.1	high chlorophyll fluorescent 107
NGS-CR-1241954	1.05988	clementine0.9_008118m PACid:19281697	AT4G05160.1	AMP-dependent synthetase and ligase family protein
NGS-CR-1251657	1.0607	clementine0.9_011681m PACid:19268870	AT5G38450.1	cytochrome P450, family 735, subfamily A, polypeptide 1
NGS-CR-1226122	1.06119	clementine0.9_005423m PACid:19255938	AT5G12220.1	las1-like family protein
NGS-CR-1207512	1.0645	clementine0.9_010102m PACid:19253584	AT3G06350.1	dehydroquinase dehydratase, putative / shikimate dehydrogenase
NGS-CR-1234504	1.06484	clementine0.9_024569m PACid:19282592	AT1G07400.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1227966	1.06772	clementine0.9_001094m PACid:19273266	AT4G33010.1	glycine decarboxylase P-protein 1
NGS-CR-1210438	1.06941	clementine0.9_003340m PACid:19271299	AT4G16370.1	oligopeptide transporter
NGS-CR-1205414	1.07127	clementine0.9_004589m PACid:19282345	AT3G12580.1	heat shock protein 70
NGS-CR-1222641	1.07305	clementine0.9_018486m PACid:19258408	AT3G29270.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1220960	1.07361	clementine0.9_029725m PACid:19285158	AT5G42940.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1235215	1.07554	clementine0.9_008386m PACid:19258990	AT1G27920.1	microtubule-associated protein 65-8
NGS-CR-1238442	1.08058	clementine0.9_008506m PACid:19268391	AT3G14690.1	cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 15
NGS-CR-1265631	1.08887	clementine0.9_019377m PACid:19275642	AT3G12890.1	activator of spomin::LUC2
NGS-CR-1225678	1.0906	clementine0.9_010338m PACid:19270017	AT1G22100.1	Inositol-pentakisphosphate 2-kinase family protein
NGS-CR-1241685	1.09061	clementine0.9_001540m PACid:19265580	AT1G55550.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily
NGS-CR-1224389	1.09315	clementine0.9_000003m PACid:19259041	AT5G23110.1	Zinc finger, C3HC4 type (RING finger) family protein
NGS-CR-1247769	1.09315	clementine0.9_008511m PACid:19266837	AT1G12370.2	photolyase 1
NGS-CR-1263967	1.0981	clementine0.9_000160m PACid:19279164	AT1G06490.1	glucan synthase-like 7
NGS-CR-1257440	1.10184	clementine0.9_000449m PACid:19256622	AT4G27190.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1220601	1.10291	clementine0.9_025134m PACid:19286088	AT4G21870.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1226013	1.1043	clementine0.9_008293m PACid:19271798	AT1G47670.1	Transmembrane amino acid transporter family protein
NGS-CR-1225268	1.10433	clementine0.9_004505m PACid:19273327	AT1G16030.1	heat shock protein 70B
NGS-CR-1225268	1.10606	clementine0.9_002012m PACid:19254798	AT3G18640.1	Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein

Tabela S1. Parte 6

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1200666	1.2495	clementine0.9_000048m PACid:19253160	AT1G36160.1	acetyl-CoA carboxylase 1
NGS-CR-1227999	1.2495	clementine0.9_017542m PACid:19282246	AT1G07120.1	
NGS-CR-1239954	1.25413	clementine0.9_025283m PACid:19261962	AT2G18660.1	plant natriuretic peptide A
NGS-CR-1219872	1.25624	clementine0.9_012233m PACid:19279175	AT3G25280.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1242028	1.25892	clementine0.9_010711m PACid:19279288	AT2G42850.1	cytochrome P450, family 718
NGS-CR-1202155	1.2595	clementine0.9_002710m PACid:19270192	AT5G42220.1	Ubiquitin-like superfamily protein
NGS-CR-1211322	1.26105	clementine0.9_014162m PACid:19253021	AT1G17020.1	senescence-related gene 1
NGS-CR-1242179	1.26151	clementine0.9_003817m PACid:19277093	AT5G52640.1	heat shock protein 90.1
NGS-CR-1224497	1.26165	clementine0.9_009307m PACid:19256152	AT5G14570.1	high affinity nitrate transporter 2.7
NGS-CR-1208700	1.26727	clementine0.9_006965m PACid:19282299	AT5G22820.2	ARM repeat superfamily protein
NGS-CR-1216561	1.26906	clementine0.9_002381m PACid:19275635	AT5G51430.1	conserved oligomeric Golgi complex component-related / COG c
NGS-CR-1273798	1.27458	clementine0.9_025486m PACid:19266600	AT5G59310.1	lipid transfer protein 4
NGS-CR-1209526	1.27949	clementine0.9_001466m PACid:19271159	AT4G18780.1	cellulose synthase family protein
NGS-CR-1225237	1.28488	clementine0.9_003162m PACid:19274753	AT3G13690.1	Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-
NGS-CR-1204056	1.28528	clementine0.9_028021m PACid:19281754	AT5G59990.1	CCT motif family protein
NGS-CR-1205749	1.29361	clementine0.9_001056m PACid:19283052	AT4G27190.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1235347	1.29464	clementine0.9_024232m PACid:19256625	AT1G55520.1	TATA binding protein 2
NGS-CR-1228254	1.31119	clementine0.9_008123m PACid:19270521	AT5G03555.1	permease, cytosine/purines, uracil, thiamine, allantoin family pro
NGS-CR-1202829	1.32124	clementine0.9_035900m PACid:19277891	AT1G33440.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1244795	1.32161	clementine0.9_022135m PACid:19255609	AT3G13130.1	
NGS-CR-1227397	1.32418	clementine0.9_020424m PACid:19261588	AT1G17860.1	Kunitz family trypsin and protease inhibitor protein
NGS-CR-1207315	1.32761	clementine0.9_030661m PACid:19252901	AT3G03640.1	beta glucosidase 25
NGS-CR-1224497	1.32917	clementine0.9_009307m PACid:19256152	AT5G14570.1	high affinity nitrate transporter 2.7
NGS-CR-1217237	1.33401	clementine0.9_007942m PACid:19261436	AT5G03760.1	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein
NGS-CR-1259556	1.3382	clementine0.9_016200m PACid:19284631	AT2G18060.1	vascular related NAC-domain protein 1
NGS-CR-1218636	1.34165	clementine0.9_030302m PACid:19273568	AT2G18950.1	homogentisate phytyltransferase 1
NGS-CR-1233388	1.34187	clementine0.9_014222m PACid:19283421	AT5G48020.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfam
NGS-CR-1259544	1.3453	clementine0.9_031785m PACid:19257750	AT4G14305.1	Peroxisomal membrane 22 kDa (Mpv17/PMP22) family protein
NGS-CR-1226945	1.34603	clementine0.9_001070m PACid:19280488	AT1G04920.1	sucrose phosphate synthase 3F
NGS-CR-1218100	1.34876	clementine0.9_028126m PACid:19274956	AT3G50610.1	
NGS-CR-1208699	1.34959	clementine0.9_014064m PACid:19262960	AT1G51120.1	AP2/B3 transcription factor family protein
NGS-CR-1210965	1.35116	clementine0.9_028022m PACid:19264811	AT4G17970.1	aluminum-activated, malate transporter 12
NGS-CR-1203006	1.35348	clementine0.9_014464m PACid:19260319	AT2G37630.1	myb-like HTH transcriptional regulator family protein

Tabela S1. Parte 7

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1210885	1.36058	clementine0.9_005342m PACid:19277765	AT1G71350.1	eukaryotic translation initiation factor SUI1 family protein
NGS-CR-1222569	1.3612	clementine0.9_014230m PACid:19270217	AT4G35890.1	winged-helix DNA-binding transcription factor family protein
NGS-CR-1215716	1.36249	clementine0.9_004028m PACid:19266718	AT1G12240.1	Glycosyl hydrolases family 32 protein
NGS-CR-1221742	1.38019	clementine0.9_029992m PACid:19261665	AT1G20925.1	Auxin efflux carrier family protein
NGS-CR-1219687	1.38248	clementine0.9_009067m PACid:19251531	AT4G37930.1	serine transhydroxymethyltransferase 1
NGS-CR-1219687	1.40125	clementine0.9_009067m PACid:19251531	AT4G37930.1	serine transhydroxymethyltransferase 1
NGS-CR-1224825	1.40728	clementine0.9_010148m PACid:19263740	AT4G13710.1	Pectin lyase-like superfamily protein
NGS-CR-1234366	1.41292	clementine0.9_030057m PACid:19262803	AT5G56080.1	nicotianamine synthase 2
NGS-CR-1215168	1.41294	clementine0.9_012046m PACid:19255784	AT2G13360.1	alanine:glyoxylate aminotransferase
NGS-CR-1243124	1.41655	clementine0.9_000328m PACid:19262622	AT3G13080.1	multidrug resistance-associated protein 3
NGS-CR-1214001	1.41737	clementine0.9_001993m PACid:19271013	AT4G12570.1	ubiquitin protein ligase 5
NGS-CR-1222572	1.42808	clementine0.9_018432m PACid:19252294	AT5G40710.1	zinc finger (C2H2 type) family protein
NGS-CR-1209437	1.43859	clementine0.9_030948m PACid:19267931	AT3G57980.1	DNA-binding bromodomain-containing protein
NGS-CR-1253671	1.44608	clementine0.9_020882m PACid:19257409	AT3G09270.1	glutathione S-transferase TAU 8
NGS-CR-1239460	1.45291	clementine0.9_034031m PACid:19251997	AT2G18950.1	homogentisate phytyltransferase 1
NGS-CR-1222591	1.46868	clementine0.9_013869m PACid:19252964	AT3G12750.1	zinc transporter 1 precursor
NGS-CR-1235088	1.46874	clementine0.9_010961m PACid:19257763	AT2G30580.1	DREB2A-interacting protein 2
NGS-CR-1216600	1.47783	clementine0.9_019943m PACid:19266659	AT3G52720.2	alpha carbonic anhydrase 1
NGS-CR-1220107	1.51192	clementine0.9_000130m PACid:19284981	AT4G35800.1	RNA polymerase II large subunit
NGS-CR-1233015	1.52054	clementine0.9_026368m PACid:19264462	AT3G61113.1	Ubiquitin related modifier 1
NGS-CR-1210712	1.54094	clementine0.9_022780m PACid:19286852	AT5G07050.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
NGS-CR-1254661	1.5489	clementine0.9_024219m PACid:19262941	AT5G26170.1	WRKY DNA-binding protein 50
NGS-CR-1220014	1.55109	clementine0.9_002902m PACid:19263818	AT4G13420.1	high affinity K <sup>+</sup> transporter 5
NGS-CR-1248945	1.56043	clementine0.9_007131m PACid:19265724	AT4G12320.1	cytochrome P450, family 706, subfamily A, polypeptide 6
NGS-CR-1218636	1.56433	clementine0.9_030302m PACid:19273568	AT2G18950.1	homogentisate phytyltransferase 1
NGS-CR-1204844	1.57618	clementine0.9_001431m PACid:19255866	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1241691	1.58126	clementine0.9_002648m PACid:19260503	AT3G53720.1	cation/H <sup>+</sup> exchanger 20
NGS-CR-1236090	1.58787	clementine0.9_022879m PACid:19265224	AT1G02870.1	
NGS-CR-1206458	1.6226	clementine0.9_024170m PACid:19262917	AT5G12020.1	17.6 kDa class II heat shock protein
NGS-CR-1202371	1.63013	clementine0.9_003850m PACid:19275238	AT5G52640.1	heat shock protein 90.1
NGS-CR-1211270	1.64415	clementine0.9_019796m PACid:19251969	AT4G31330.1	Protein of unknown function, DUF599
NGS-CR-1222436	1.64776	clementine0.9_008453m PACid:19282059	AT3G47340.1	glutamine-dependent asparagine synthase 1
NGS-CR-1255018	1.66028	clementine0.9_002663m PACid:19254796	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein



Tabela S1. Parte 8

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1204056	1.69181	clementine0.9_028021m PACid:19281754	AT5G59990.1	CCT motif family protein
NGS-CR-1213429	1.69192	clementine0.9_032038m PACid:19282266	AT2G28780.1	
NGS-CR-1223948	1.69418	clementine0.9_023322m PACid:19282130	AT5G58575.1	
NGS-CR-1212841	1.69627	clementine0.9_024761m PACid:19282233		
NGS-CR-1247162	1.75091	clementine0.9_033594m PACid:19261044	AT1G65480.1	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein
NGS-CR-1222093	1.76646	clementine0.9_013182m PACid:19267520	AT2G38560.1	transcript elongation factor IIS
NGS-CR-1274702	1.77487	clementine0.9_020680m PACid:19276390	AT3G54420.1	homolog of carrot EP3-3 chitinase
NGS-CR-1247176	1.78881	clementine0.9_006059m PACid:19273211	AT2G26690.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1226862	1.82202	clementine0.9_034300m PACid:19263042	AT4G30380.1	Barwin-related endoglucanase
NGS-CR-1200567	1.84587	clementine0.9_000179m PACid:19265827	AT1G55325.2	RNA polymerase II transcription mediators
NGS-CR-1255018	1.8522	clementine0.9_002663m PACid:19254796	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1226862	1.85676	clementine0.9_034300m PACid:19263042	AT4G30380.1	Barwin-related endoglucanase
NGS-CR-1220669	1.86905	clementine0.9_020881m PACid:19257624	AT3G09270.1	glutathione S-transferase TAU 8
NGS-CR-1202145	1.88764	clementine0.9_001319m PACid:19263184	AT4G30110.1	heavy metal atpase 2
NGS-CR-1230865	1.89019	clementine0.9_011523m PACid:19257568	AT1G04420.1	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
NGS-CR-1247769	1.89912	clementine0.9_008511m PACid:19266837	AT1G12370.2	photolyase 1
NGS-CR-1222436	1.9977	clementine0.9_008453m PACid:19282059	AT3G47340.1	glutamine-dependent asparagine synthase 1
NGS-CR-1247162	2.01028	clementine0.9_023420m PACid:19285502	AT1G65480.1	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein
NGS-CR-1204364	2.01122	clementine0.9_033951m PACid:19286816	AT5G07050.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
NGS-CR-1260428	2.1097	clementine0.9_015499m PACid:19266391	AT5G54160.1	O-methyltransferase 1
NGS-CR-1214531	2.11828	clementine0.9_000548m PACid:19264862	AT4G00230.1	xylem serine peptidase 1
NGS-CR-1222436	2.14947	clementine0.9_008453m PACid:19282059	AT3G47340.1	glutamine-dependent asparagine synthase 1
NGS-CR-1208699	2.21376	clementine0.9_014064m PACid:19262960	AT1G51120.1	AP2/B3 transcription factor family protein
NGS-CR-1209079	2.36333	clementine0.9_027848m PACid:19251906	AT5G20410.1	monogalactosyldiacylglycerol synthase 2
NGS-CR-1236809	2.36563	clementine0.9_018766m PACid:19269008		
NGS-CR-1242217	2.40936	clementine0.9_020138m PACid:19251876	AT2G18950.1	homogentisate phytyltransferase 1
NGS-CR-1202856	2.58555	clementine0.9_003400m PACid:19280486	AT2G32810.1	beta galactosidase 9
NGS-CR-1204844	2.64522	clementine0.9_001431m PACid:19255866	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1245324	2.69285	clementine0.9_032904m PACid:19256757	AT3G24220.1	nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 6
NGS-CR-1214948	2.76714	clementine0.9_000283m PACid:19262035	AT4G33200.1	myosin, putative

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	*Arabidopsis code	**Products BLASTX against Arabidopsis
<b>Genes reprimidos</b>				
<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	*Arabidopsis code	**Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1133634	-1.00332	clementine0.9_025662m^tPACid:19270614	AT1G30135.1	jasmonate-zim-domain protein 8
NGS-CR-1101565	-1.0054	clementine0.9_014502m^tPACid:19267237	AT1G08370.1	decapping 1
NGS-CR-1122015	-1.00713	clementine0.9_005371m^tPACid:19282573	AT5G58000.1	Reticulon family protein
NGS-CR-1145259	-1.00718	clementine0.9_002041m^tPACid:19257036	AT2G25600.1	Shaker pollen inward K+ channel
NGS-CR-1137304	-1.00796	clementine0.9_017916m^tPACid:19258691	AT3G62200.1	Putative endonuclease or glycosyl hydrolase
NGS-CR-1147934	-1.00841	clementine0.9_010250m^tPACid:19268545	AT4G10720.1	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1104496	-1.01109	clementine0.9_005115m^tPACid:19254125	AT1G54510.1	NIMA-related serine/threonine kinase 1
NGS-CR-1120777	-1.01125	clementine0.9_016561m^tPACid:19281784	AT3G45300.1	isovaleryl-CoA-dehydrogenase
NGS-CR-1123757	-1.01156	clementine0.9_014047m^tPACid:19269662	AT3G52060.1	Core-2/I-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase fa
NGS-CR-1113321	-1.01247	clementine0.9_019631m^tPACid:19278858	AT1G03970.1	G-box binding factor 4
NGS-CR-1111897	-1.01281	clementine0.9_012644m^tPACid:19263068	AT2G24300.2	Calmodulin-binding protein
NGS-CR-1150493	-1.01309	clementine0.9_010065m^tPACid:19285336	AT2G01940.1	C2H2-like zinc finger protein
NGS-CR-1123751	-1.01346	clementine0.9_024538m^tPACid:19278713	AT3G15680.1	Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein
NGS-CR-1104259	-1.01375	clementine0.9_017215m^tPACid:19276385	AT3G25520.1	ribosomal protein L5
NGS-CR-1160958	-1.01554	clementine0.9_023846m^tPACid:19252132	AT3G01980.3	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
NGS-CR-1122624	-1.01573	clementine0.9_007801m^tPACid:19274588	AT5G07990.1	Cytochrome P450 superfamily protein
NGS-CR-1103920	-1.01653	clementine0.9_015478m^tPACid:19268389	AT1G78440.1	Arabidopsis thaliana gibberellin 2-oxidase 1
NGS-CR-1119633	-1.02076	clementine0.9_024496m^tPACid:19271487	AT4G20970.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
NGS-CR-1160085	-1.02254	clementine0.9_017041m^tPACid:19256163	AT1G03820.1	
NGS-CR-1141578	-1.0239	clementine0.9_016875m^tPACid:19273468	AT1G14180.2	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1129958	-1.02733	clementine0.9_023558m^tPACid:19276456	AT1G63310.1	
NGS-CR-1137838	-1.02803	clementine0.9_004972m^tPACid:19276775	AT1G64390.1	glycosyl hydrolase 9C2
NGS-CR-1132978	-1.02835	clementine0.9_020342m^tPACid:19252670	AT2G16050.1	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
NGS-CR-1134027	-1.03061	clementine0.9_014869m^tPACid:19259099	AT1G13250.1	galacturonosyltransferase-like 3
NGS-CR-1110561	-1.03236	clementine0.9_006421m^tPACid:19269259	AT5G22090.1	Protein of unknown function (DUF3049)
NGS-CR-1145105	-1.03251	clementine0.9_023713m^tPACid:19260536	AT5G18970.1	AWPM-19-like family protein
NGS-CR-1124846	-1.03255	clementine0.9_019155m^tPACid:19281897	AT2G39700.1	expansin A4
NGS-CR-1133163	-1.03352	clementine0.9_034555m^tPACid:19281037	AT1G70830.1	MLP-like protein 28
NGS-CR-1143059	-1.03511	clementine0.9_016157m^tPACid:19268762	AT4G19230.1	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1
NGS-CR-1161503	-1.03674	clementine0.9_027527m^tPACid:19272335	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein

Tabela S1. Parte 10

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	*Arabidopsis code	**Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1136924	-1.03748	clementine0.9_011921m^tPACid:19277181	AT4G24780.1	Pectin lyase-like superfamily protein
NGS-CR-1107371	-1.03887	clementine0.9_003754m^tPACid:19265866	AT3G13670.1	Protein kinase family protein
NGS-CR-1130371	-1.03894	clementine0.9_021938m^tPACid:19263321		
NGS-CR-1107656	-1.04006	clementine0.9_018235m^tPACid:19265739	AT1G55480.1	protein containing PDZ domain, a K-box domain, and a TPR region
NGS-CR-1111640	-1.04316	clementine0.9_000696m^tPACid:19286079	AT3G54460.1	SNF2 domain-containing protein / helicase domain-containing protein
NGS-CR-1175057	-1.04426	clementine0.9_001767m^tPACid:19258661	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1161798	-1.04522	clementine0.9_007325m^tPACid:19268061	AT5G01220.1	sulfoquinovosyldiacylglycerol 2
NGS-CR-1127152	-1.04588	clementine0.9_002564m^tPACid:19253661	AT5G26910.1	
NGS-CR-1170014	-1.04855	clementine0.9_023021m^tPACid:19281837	AT2G41475.1	Embryo-specific protein 3, (ATS3)
NGS-CR-1136178	-1.04966	clementine0.9_002738m^tPACid:19269644	AT3G52490.1	Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolase
NGS-CR-1105323	-1.05069	clementine0.9_016690m^tPACid:19282856	AT5G64260.1	EXORDIUM like 2
NGS-CR-1131204	-1.05235	clementine0.9_027783m^tPACid:19263575	AT1G03020.1	Thioredoxin superfamily protein
NGS-CR-1100638	-1.05486	clementine0.9_014040m^tPACid:19260064	AT5G40270.1	HD domain-containing metal-dependent phosphohydrolase family protein
NGS-CR-1119090	-1.05707	clementine0.9_034016m^tPACid:19268165	AT3G01680.1	
NGS-CR-1120541	-1.05831	clementine0.9_022171m^tPACid:19269202	AT4G39900.1	
NGS-CR-1105072	-1.06026	clementine0.9_011526m^tPACid:19286149	AT2G26560.1	phospholipase A 2A
NGS-CR-1125018	-1.06066	clementine0.9_019396m^tPACid:19285947	AT4G19840.1	phloem protein 2-A1
NGS-CR-1101318	-1.06168	clementine0.9_000615m^tPACid:19267159	AT5G04930.1	aminophospholipid ATPase 1
NGS-CR-1146729	-1.06238	clementine0.9_018083m^tPACid:19281899	AT5G22930.1	Protein of unknown function (DUF1635)
NGS-CR-1118550	-1.06287	clementine0.9_005466m^tPACid:19274402	AT1G72790.1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
NGS-CR-1156314	-1.06375	clementine0.9_027966m^tPACid:19265740	AT4G19110.2	Protein kinase superfamily protein
NGS-CR-1166040	-1.06569	clementine0.9_034240m^tPACid:19276750	AT4G01550.1	NAC domain containing protein 69
NGS-CR-1156460	-1.0665	clementine0.9_029887m^tPACid:19265679	AT4G31980.1	
NGS-CR-1121897	-1.06772	clementine0.9_016386m^tPACid:19255292	AT1G52360.1	Coatomer, beta subunit
NGS-CR-1137929	-1.06835	clementine0.9_006061m^tPACid:19267091	AT5G37570.1	Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein
NGS-CR-1175490	-1.06835	clementine0.9_010773m^tPACid:19263516	AT3G25130.1	
NGS-CR-1152850	-1.06835	clementine0.9_010883m^tPACid:19263600	AT4G00770.1	
NGS-CR-1118035	-1.06835	clementine0.9_012224m^tPACid:19264698	AT4G03010.1	RNI-like superfamily protein
NGS-CR-1136260	-1.06835	clementine0.9_025137m^tPACid:19262488		
NGS-CR-1160012	-1.06858	clementine0.9_033171m^tPACid:19284222	AT3G12530.1	PSF2
NGS-CR-1111604	-1.06931	clementine0.9_009096m^tPACid:19270209	AT5G66730.1	C2H2-like zinc finger protein
NGS-CR-1100079	-1.07039	clementine0.9_003057m^tPACid:19255658	AT5G17920.1	Cobalamin-independent synthase family protein
NGS-CR-1152232	-1.07113	clementine0.9_034397m^tPACid:19282787	AT3G14460.1	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein

Tabela S1. Parte 11

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1127106	-1.07856	clementine0.9_023105m^tPACid:19267567	AT3G53970.2	proteasome inhibitor-related
NGS-CR-1149915	-1.07872	clementine0.9_004915m^tPACid:19259418	AT1G70370.1	polygalacturonase 2
NGS-CR-1132104	-1.07878	clementine0.9_025376m^tPACid:19273725	AT2G26695.1	Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein
NGS-CR-1118037	-1.07917	clementine0.9_024862m^tPACid:19271517	AT2G33810.1	squamosa promoter binding protein-like 3
NGS-CR-1137236	-1.07959	clementine0.9_015429m^tPACid:19260118	AT3G26590.1	MATE efflux family protein
NGS-CR-1125350	-1.08227	clementine0.9_002845m^tPACid:19269954	AT1G42540.1	glutamate receptor 3.3
NGS-CR-1138472	-1.08238	clementine0.9_007645m^tPACid:19276537	AT3G48090.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
NGS-CR-1144114	-1.08462	clementine0.9_013852m^tPACid:19275605	AT1G79430.2	Homeodomain-like superfamily protein
NGS-CR-1159638	-1.08475	clementine0.9_012091m^tPACid:19268029	AT5G24910.1	cytochrome P450, family 714, subfamily A, polypeptide 1
NGS-CR-1105057	-1.08479	clementine0.9_008684m^tPACid:19276397	AT2G31880.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1120771	-1.08645	clementine0.9_031692m^tPACid:19272377	AT5G54250.1	cyclic nucleotide-gated cation channel 4
NGS-CR-1116975	-1.08654	clementine0.9_004773m^tPACid:19273195	AT1G68400.1	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protei
NGS-CR-1141414	-1.08769	clementine0.9_019404m^tPACid:19251510	AT4G37450.1	arabinogalactan protein 18
NGS-CR-1140727	-1.09427	clementine0.9_009723m^tPACid:19273254	AT5G26030.1	ferrochelatase 1
NGS-CR-1126535	-1.09668	clementine0.9_011505m^tPACid:19252199	AT5G14220.1	Flavin containing amine oxidoreductase family
NGS-CR-1126921	-1.09756	clementine0.9_007040m^tPACid:19259430	AT5G62890.1	Xanthine/uracil permease family protein
NGS-CR-1100331	-1.09826	clementine0.9_026492m^tPACid:19284462	AT3G55240.1	Plant protein 1589 of unknown function
NGS-CR-1127349	-1.09881	clementine0.9_016881m^tPACid:19271774	AT4G34410.1	redox responsive transcription factor 1
NGS-CR-1142887	-1.09912	clementine0.9_011078m^tPACid:19265554	AT4G31980.1	
NGS-CR-1167672	-1.09912	clementine0.9_034998m^tPACid:19258782	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1141590	-1.10472	clementine0.9_035164m^tPACid:19282860	AT4G18750.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
NGS-CR-1118747	-1.11128	clementine0.9_027113m^tPACid:19273735		
NGS-CR-1133437	-1.11184	clementine0.9_003553m^tPACid:19256150	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1158916	-1.11396	clementine0.9_034664m^tPACid:19255766	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1121813	-1.11742	clementine0.9_004747m^tPACid:19262314	AT2G23950.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1165416	-1.11836	clementine0.9_028396m^tPACid:19280191	AT3G06240.1	F-box family protein
NGS-CR-1158916	-1.12092	clementine0.9_034664m^tPACid:19255766	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1112604	-1.12242	clementine0.9_001778m^tPACid:19277596	AT1G17680.1	tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein
NGS-CR-1150163	-1.12337	clementine0.9_005579m^tPACid:19264958	AT5G41315.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
NGS-CR-1163751	-1.12694	clementine0.9_022133m^tPACid:19257570	AT3G13430.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1117811	-1.12719	clementine0.9_005510m^tPACid:19252863	AT5G23400.1	Leucine-rich repeat (LRR) family protein
NGS-CR-1115452	-1.12898	clementine0.9_007725m^tPACid:19282040	AT3G26700.1	Protein kinase superfamily protein
NGS-CR-1147575	-1.12908	clementine0.9_021161m^tPACid:19269253	AT5G04760.1	Duplicated homeodomain-like superfamily protein
NGS-CR-1149677	-1.13026	clementine0.9_000647m^tPACid:19285492	AT3G14460.1	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein

Tabela S1. Parte 12

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1156132	-1.13334	clementine0.9_026491m^tPACid:19286782	AT1G74670.1	Gibberellin-regulated family protein
NGS-CR-1105452	-1.13481	clementine0.9_020100m^tPACid:19282646	AT5G06720.1	peroxidase 2
NGS-CR-1121081	-1.13549	clementine0.9_022674m^tPACid:19258320	AT3G28210.1	zinc finger (AN1-like) family protein
NGS-CR-1118037	-1.13584	clementine0.9_024862m^tPACid:19271517	AT2G33810.1	squamosa promoter binding protein-like 3
NGS-CR-1116414	-1.1379	clementine0.9_015724m^tPACid:19279492	AT3G21770.1	Peroxidase superfamily protein
NGS-CR-1132559	-1.13878	clementine0.9_006923m^tPACid:19284598	AT5G66920.1	SKU5 similar 17
NGS-CR-1153012	-1.14104	clementine0.9_027875m^tPACid:19282698	AT3G14470.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1150493	-1.14246	clementine0.9_010065m^tPACid:19285336	AT2G01940.1	C2H2-like zinc finger protein
NGS-CR-1103956	-1.15016	clementine0.9_032686m^tPACid:19273720	AT5G25180.1	cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 14
NGS-CR-1107174	-1.15084	clementine0.9_025144m^tPACid:19276747		
NGS-CR-1162189	-1.15173	clementine0.9_023241m^tPACid:19266021	AT2G25770.1	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily pr
NGS-CR-1129255	-1.15568	clementine0.9_002648m^tPACid:19260503	AT3G53720.1	cation/H+ exchanger 20
NGS-CR-1141590	-1.15758	clementine0.9_035164m^tPACid:19282860	AT4G18750.1	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein
NGS-CR-1114965	-1.16037	clementine0.9_013305m^tPACid:19265124	AT3G61440.1	cysteine synthase C1
NGS-CR-1116896	-1.16357	clementine0.9_035443m^tPACid:19258546	AT5G15410.2	Cyclic nucleotide-regulated ion channel family protein
NGS-CR-1130390	-1.16688	clementine0.9_013234m^tPACid:19260744	AT4G02340.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
NGS-CR-1142292	-1.16744	clementine0.9_004244m^tPACid:19284098	AT5G02500.1	heat shock cognate protein 70-1
NGS-CR-1140987	-1.16744	clementine0.9_006431m^tPACid:19271270	AT1G29690.1	MAC/Perforin domain-containing protein
NGS-CR-1144753	-1.16832	clementine0.9_024507m^tPACid:19259354	AT3G57810.2	Cysteine proteinases superfamily protein
NGS-CR-1158429	-1.16843	clementine0.9_026717m^tPACid:19258797	AT2G22240.2	myo-inositol-1-phosphate synthase 2
NGS-CR-1152869	-1.16844	clementine0.9_012664m^tPACid:19260427	AT5G18840.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1129255	-1.1685	clementine0.9_002648m^tPACid:19260503	AT3G53720.1	cation/H+ exchanger 20
NGS-CR-1151345	-1.16907	clementine0.9_017861m^tPACid:19266362	AT3G06200.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfam
NGS-CR-1148447	-1.17268	clementine0.9_017017m^tPACid:19270199	AT1G21050.1	Protein of unknown function, DUF617
NGS-CR-1151605	-1.17389	clementine0.9_024472m^tPACid:19266170	AT4G39700.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
NGS-CR-1148755	-1.17657	clementine0.9_002306m^tPACid:19280066	AT3G47110.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1121813	-1.17716	clementine0.9_004747m^tPACid:19262314	AT2G23950.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1171909	-1.1787	clementine0.9_022393m^tPACid:19252342	AT4G28310.1	
NGS-CR-1154038	-1.18126	clementine0.9_015955m^tPACid:19252004	AT1G80840.1	WRKY DNA-binding protein 40
NGS-CR-1101936	-1.18131	clementine0.9_014847m^tPACid:19272751	AT1G71695.1	Peroxidase superfamily protein
NGS-CR-1152472	-1.18341	clementine0.9_018696m^tPACid:19273944	AT5G06740.1	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein
NGS-CR-1142412	-1.18452	clementine0.9_022091m^tPACid:19284839	AT3G50770.1	calmodulin-like 41
NGS-CR-1128980	-1.18452	clementine0.9_024540m^tPACid:19258066	AT4G25470.1	C-repeat/DRE binding factor 2

Tabela S1. Parte 13

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1145362	-1.18614	clementine0.9_002226m^tPACid:19267512	AT3G52490.1	Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate h
NGS-CR-1163968	-1.18659	clementine0.9_002340m^tPACid:19286950	AT1G73370.1	sucrose synthase 6
NGS-CR-1103304	-1.18677	clementine0.9_013703m^tPACid:19265361	AT5G24110.1	WRKY DNA-binding protein 30
NGS-CR-1137119	-1.19086	clementine0.9_005661m^tPACid:19270567	AT1G48480.1	receptor-like kinase 1
NGS-CR-1146275	-1.19352	clementine0.9_014445m^tPACid:19270595	AT1G48580.1	
NGS-CR-1125303	-1.19551	clementine0.9_027988m^tPACid:19276229		
NGS-CR-1154272	-1.19575	clementine0.9_029482m^tPACid:19269224	AT2G34930.1	disease resistance family protein / LRR family protein
NGS-CR-1123174	-1.19584	clementine0.9_024967m^tPACid:19260792	AT5G49120.1	Protein of unknown function (DUF581)
NGS-CR-1116896	-1.19995	clementine0.9_035443m^tPACid:19258546	AT5G15410.2	Cyclic nucleotide-regulated ion channel family protein
NGS-CR-1135652	-1.20201	clementine0.9_016675m^tPACid:19264581	AT3G60800.1	DHHC-type zinc finger family protein
NGS-CR-1136392	-1.20283	clementine0.9_016627m^tPACid:19255721	AT2G27140.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1104537	-1.20416	clementine0.9_009510m^tPACid:19268815	AT5G38970.1	brassinosteroid-6-oxidase 1
NGS-CR-1146676	-1.20811	clementine0.9_006710m^tPACid:19278990	AT1G71490.1	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
NGS-CR-1109511	-1.20852	clementine0.9_012704m^tPACid:19252046	AT3G02040.1	senescence-related gene 3
NGS-CR-1137215	-1.21085	clementine0.9_012852m^tPACid:19259389	AT1G23340.1	Protein of Unknown Function (DUF239)
NGS-CR-1110069	-1.21273	clementine0.9_006651m^tPACid:19265042	AT4G02940.1	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
NGS-CR-1101655	-1.21273	clementine0.9_020883m^tPACid:19273799	AT5G11810.1	
NGS-CR-1112725	-1.22069	clementine0.9_020972m^tPACid:19255978	AT5G19855.1	Chaperonin-like RbcX protein
NGS-CR-1175614	-1.22283	clementine0.9_024966m^tPACid:19263914	AT1G08880.1	Histone superfamily protein
NGS-CR-1144846	-1.23152	clementine0.9_014633m^tPACid:19281561	AT5G16530.1	Auxin efflux carrier family protein
NGS-CR-1105072	-1.2316	clementine0.9_011526m^tPACid:19286149	AT2G26560.1	phospholipase A 2A
NGS-CR-1127837	-1.23198	clementine0.9_021396m^tPACid:19281192	AT1G73320.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfi
NGS-CR-1107406	-1.23399	clementine0.9_005845m^tPACid:19254949	AT3G14310.1	pectin methylesterase 3
NGS-CR-1103114	-1.23573	clementine0.9_030254m^tPACid:19255835	AT3G01680.1	
NGS-CR-1109534	-1.23758	clementine0.9_015159m^tPACid:19286638	AT5G04430.2	binding to TOMV RNA 1L (long form)
NGS-CR-1114152	-1.23802	clementine0.9_025117m^tPACid:19258570	AT5G39950.1	thioredoxin 2
NGS-CR-1156183	-1.23849	clementine0.9_027914m^tPACid:19273478	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1167672	-1.24271	clementine0.9_034998m^tPACid:19258782	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1138572	-1.24502	clementine0.9_006698m^tPACid:19258634	AT5G40140.1	RING/U-box superfamily protein with ARM repeat domain
NGS-CR-1150143	-1.25313	clementine0.9_027082m^tPACid:19283535	AT5G04080.1	
NGS-CR-1143059	-1.25456	clementine0.9_016157m^tPACid:19268762	AT4G19230.1	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 1
NGS-CR-1109246	-1.25755	clementine0.9_004467m^tPACid:19274543	AT3G18670.1	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1154487	-1.25759	clementine0.9_001768m^tPACid:19285089	AT2G23380.1	SET domain-containing protein

Tabela S1. Parte 14

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1113234	-1.25785	clementine0.9_022457m^tPACid:19259138	AT1G27300.1	
NGS-CR-1133212	-1.25941	clementine0.9_013877m^tPACid:19276308	AT5G11880.1	Pyridoxal-dependent decarboxylase family protein
NGS-CR-1149498	-1.25941	clementine0.9_024231m^tPACid:19260061	AT1G23530.1	
NGS-CR-1110222	-1.26211	clementine0.9_032954m^tPACid:19254245	AT1G72210.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
NGS-CR-1138749	-1.26251	clementine0.9_010639m^tPACid:19251699	AT5G67460.1	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
NGS-CR-1151659	-1.26328	clementine0.9_015227m^tPACid:19269769	AT1G19980.1	cytomatrix protein-related
NGS-CR-1120058	-1.26356	clementine0.9_002599m^tPACid:19281971	AT1G07510.1	FTSH protease 10
NGS-CR-1165135	-1.26447	clementine0.9_026821m^tPACid:19268216		
NGS-CR-1102859	-1.26595	clementine0.9_005072m^tPACid:19286889	AT1G80270.1	PENTATRICOPEPTIDE REPEAT 596
NGS-CR-1128614	-1.26752	clementine0.9_003766m^tPACid:19259480	AT3G01680.1	
NGS-CR-1112846	-1.27142	clementine0.9_023254m^tPACid:19268089	AT2G41000.1	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein
NGS-CR-1149915	-1.27505	clementine0.9_004915m^tPACid:19259418	AT1G70370.1	polygalacturonase 2
NGS-CR-1137106	-1.27541	clementine0.9_009072m^tPACid:19284559	AT2G25737.1	Sulfite exporter TauE/SafE family protein
NGS-CR-1105999	-1.27543	clementine0.9_013784m^tPACid:19253696		
NGS-CR-1105809	-1.27784	clementine0.9_002227m^tPACid:19279930	AT5G61960.1	MEI2-like protein 1
NGS-CR-1113353	-1.27807	clementine0.9_017355m^tPACid:19256673	AT3G04030.3	Homeodomain-like superfamily protein
NGS-CR-1124961	-1.28087	clementine0.9_008678m^tPACid:19279547	AT1G04680.1	Pectin lyase-like superfamily protein
NGS-CR-1128789	-1.28193	clementine0.9_002175m^tPACid:19256056	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1104743	-1.28538	clementine0.9_020320m^tPACid:19274672	AT1G19180.1	jasmonate-zim-domain protein 1
NGS-CR-1140784	-1.28801	clementine0.9_036012m^tPACid:19263128	AT5G38240.1	Protein kinase family protein
NGS-CR-1132122	-1.28834	clementine0.9_024729m^tPACid:19254937	AT1G53903.1	Protein of unknown function (DUF581)
NGS-CR-1167672	-1.28859	clementine0.9_034998m^tPACid:19258782	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1106372	-1.28942	clementine0.9_007139m^tPACid:19275530	AT3G57530.1	calcium-dependent protein kinase 32
NGS-CR-1106362	-1.29052	clementine0.9_021889m^tPACid:19254987	AT1G52140.1	
NGS-CR-1156266	-1.2915	clementine0.9_011259m^tPACid:19278374	AT3G20660.1	organic cation/carnitine transporter4
NGS-CR-1116128	-1.29749	clementine0.9_020530m^tPACid:19264328		
NGS-CR-1132559	-1.30106	clementine0.9_006923m^tPACid:19284598	AT5G66920.1	SKU5 similar 17
NGS-CR-1145779	-1.30286	clementine0.9_021431m^tPACid:19266840		
NGS-CR-1165222	-1.3031	clementine0.9_005942m^tPACid:19282227	AT3G08510.1	phospholipase C 2
NGS-CR-1155178	-1.3043	clementine0.9_014824m^tPACid:19270949	AT1G11915.1	
NGS-CR-1137976	-1.30472	clementine0.9_009825m^tPACid:19268329	AT4G10720.2	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1114279	-1.30495	clementine0.9_004680m^tPACid:19282179	AT5G59730.1	exocyst subunit exo70 family protein H7
NGS-CR-1116471	-1.3083	clementine0.9_022863m^tPACid:19251982	AT5G10870.1	chorismate mutase 2

Tabela S1. Parte 15

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1105905	-1.30947	clementine0.9_015858m^tPACid:19253260	AT4G08950.1	Phosphate-responsive 1 family protein
NGS-CR-1133926	-1.31522	clementine0.9_011785m^tPACid:19263235	AT4G03460.1	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1105800	-1.31981	clementine0.9_019770m^tPACid:19256871	AT3G58720.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1121724	-1.32371	clementine0.9_016416m^tPACid:19279340	AT2G42840.1	protodermal factor 1
NGS-CR-1130225	-1.32786	clementine0.9_006047m^tPACid:19267050	AT4G16650.1	O-fucosyltransferase family protein
NGS-CR-1142169	-1.32907	clementine0.9_016938m^tPACid:19251518	AT1G10380.1	Putative membrane lipoprotein
NGS-CR-1125556	-1.33232	clementine0.9_024775m^tPACid:19263467	AT2G04520.1	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
NGS-CR-1157739	-1.33246	clementine0.9_007187m^tPACid:19275890	AT5G53130.1	cyclic nucleotide gated channel 1
NGS-CR-1128554	-1.33331	clementine0.9_024255m^tPACid:19259735		
NGS-CR-1101035	-1.33356	clementine0.9_023814m^tPACid:19256878		
NGS-CR-1134104	-1.33383	clementine0.9_008228m^tPACid:19284406	AT2G39830.1	DA1-related protein 2
NGS-CR-1106147	-1.33502	clementine0.9_008815m^tPACid:19264711	AT2G46630.1	
NGS-CR-1140799	-1.33947	clementine0.9_016312m^tPACid:19261819	AT5G20910.1	RING/U-box superfamily protein
NGS-CR-1128841	-1.3433	clementine0.9_005461m^tPACid:19264854	AT4G00570.1	NAD-dependent malic enzyme 2
NGS-CR-1169640	-1.34485	clementine0.9_030343m^tPACid:19254859	AT5G48050.1	
NGS-CR-1110683	-1.3466	clementine0.9_003541m^tPACid:19265386	AT5G49880.1	mitotic checkpoint family protein
NGS-CR-1105057	-1.34752	clementine0.9_008684m^tPACid:19276397	AT2G31880.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1130566	-1.34907	clementine0.9_008774m^tPACid:19278645	AT1G59740.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1101967	-1.35345	clementine0.9_000161m^tPACid:19263944	AT3G60860.1	SEC7-like guanine nucleotide exchange family protein
NGS-CR-1135326	-1.35603	clementine0.9_009763m^tPACid:19278434	AT4G33270.1	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein
NGS-CR-1151742	-1.35603	clementine0.9_028328m^tPACid:19274689	AT3G50520.1	Phosphoglycerate mutase family protein
NGS-CR-1178995	-1.35603	clementine0.9_029923m^tPACid:19281320	AT3G14470.1	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
NGS-CR-1149945	-1.35603	clementine0.9_031943m^tPACid:19253964	AT5G45320.1	
NGS-CR-1172469	-1.36317	clementine0.9_027147m^tPACid:19267134		
NGS-CR-1125470	-1.37398	clementine0.9_017383m^tPACid:19281789	AT5G13870.1	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 5
NGS-CR-1109246	-1.37438	clementine0.9_004467m^tPACid:19274543	AT3G18670.1	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1133305	-1.37488	clementine0.9_023294m^tPACid:19251391	AT1G10630.1	ADP-ribosylation factor A1F
NGS-CR-1141414	-1.38136	clementine0.9_019404m^tPACid:19251510	AT4G37450.1	arabinogalactan protein 18
NGS-CR-1125627	-1.3825	clementine0.9_026058m^tPACid:19262303	AT2G43670.1	Carbohydrate-binding X8 domain superfamily protein
NGS-CR-1118628	-1.39073	clementine0.9_025166m^tPACid:19273432		
NGS-CR-1141953	-1.39113	clementine0.9_002655m^tPACid:19280718	AT2G16440.1	Minichromosome maintenance (MCM2/3/5) family protein
NGS-CR-1105487	-1.39321	clementine0.9_020581m^tPACid:19252346	AT5G40650.1	succinate dehydrogenase 2-2
NGS-CR-1169640	-1.39343	clementine0.9_030343m^tPACid:19254859	AT5G48050.1	
NGS-CR-1129472	-1.39624	clementine0.9_000232m^tPACid:19270415	AT1G71220.1	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferases;transferases



Tabela S1. Parte 16

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1143031	-1.39873	clementine0.9_012046m^tPACid:19255784	AT2G13360.1	alanine:glyoxylate aminotransferase
NGS-CR-1169053	-1.40483	clementine0.9_028459m^tPACid:19279948	AT5G06850.1	C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family
NGS-CR-1107456	-1.40967	clementine0.9_025729m^tPACid:19256820		
NGS-CR-1104682	-1.4101	clementine0.9_023211m^tPACid:19266665		
NGS-CR-1145362	-1.42503	clementine0.9_002226m^tPACid:19267512	AT3G52490.1	Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate f
NGS-CR-1105331	-1.42503	clementine0.9_030262m^tPACid:19261835	AT3G13000.2	Protein of unknown function, DUF547
NGS-CR-1132847	-1.42845	clementine0.9_008426m^tPACid:19273794	AT2G03500.1	Homeodomain-like superfamily protein
NGS-CR-1100313	-1.43312	clementine0.9_020973m^tPACid:19254996	AT1G14520.1	myo-inositol oxygenase 1
NGS-CR-1138533	-1.43371	clementine0.9_002195m^tPACid:19256864	AT2G42700.1	
NGS-CR-1126595	-1.43608	clementine0.9_005484m^tPACid:19275915	AT3G12670.1	CTP synthase family protein
NGS-CR-1115766	-1.44297	clementine0.9_012058m^tPACid:19255963	AT3G03740.1	BTB-POZ and MATH domain 4
NGS-CR-1142929	-1.44455	clementine0.9_023461m^tPACid:19276693		
NGS-CR-1102261	-1.44691	clementine0.9_009735m^tPACid:19283944	AT2G39710.1	Eukaryotic aspartyl protease family protein
NGS-CR-1113276	-1.45513	clementine0.9_008471m^tPACid:19282123	AT5G58720.1	smr (Small MutS Related) domain-containing protein
NGS-CR-1133305	-1.45668	clementine0.9_023294m^tPACid:19251391	AT1G10630.1	ADP-ribosylation factor A1F
NGS-CR-1152445	-1.45739	clementine0.9_020536m^tPACid:19257549	AT5G43650.1	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
NGS-CR-1100319	-1.45796	clementine0.9_026583m^tPACid:19273376	AT5G43150.1	
NGS-CR-1117070	-1.4614	clementine0.9_006961m^tPACid:19264666	AT2G31270.1	homolog of yeast CDT1 A
NGS-CR-1171019	-1.4614	clementine0.9_032838m^tPACid:19262410	AT2G34930.1	disease resistance family protein / LRR family protein
NGS-CR-1139760	-1.46301	clementine0.9_005099m^tPACid:19255387	AT2G37080.1	ROP interactive partner 3
NGS-CR-1155435	-1.46638	clementine0.9_016854m^tPACid:19254383	AT5G64260.1	EXORDIUM like 2
NGS-CR-1146426	-1.46638	clementine0.9_019436m^tPACid:19276160	AT5G22930.1	Protein of unknown function (DUF1635)
NGS-CR-1125018	-1.47135	clementine0.9_019396m^tPACid:19285947	AT4G19840.1	phloem protein 2-A1
NGS-CR-1160326	-1.47608	clementine0.9_019455m^tPACid:19274955	AT3G50060.1	myb domain protein 77
NGS-CR-1143379	-1.47879	clementine0.9_019246m^tPACid:19277127	AT5G15090.1	voltage dependent anion channel 3
NGS-CR-1103513	-1.47956	clementine0.9_024650m^tPACid:19276529		
NGS-CR-1113437	-1.48072	clementine0.9_022546m^tPACid:19272935	AT1G35680.1	Ribosomal protein L21
NGS-CR-1146247	-1.48172	clementine0.9_018763m^tPACid:19253279	AT1G02170.1	metacaspase 1
NGS-CR-1147934	-1.48233	clementine0.9_010250m^tPACid:19268545	AT4G10720.1	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1125952	-1.49064	clementine0.9_017124m^tPACid:19260495	AT2G37390.1	Chloroplast-targeted copper chaperone protein
NGS-CR-1177280	-1.49118	clementine0.9_007892m^tPACid:19275099	AT1G16390.1	organic cation/carnitine transporter 3
NGS-CR-1106384	-1.49175	clementine0.9_010299m^tPACid:19251333	AT2G22360.1	DNAJ heat shock family protein
NGS-CR-1125952	-1.49217	clementine0.9_017124m^tPACid:19260495	AT2G37390.1	Chloroplast-targeted copper chaperone protein

Tabela S1. Parte 17

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1142140	-1.49224	clementine0.9_025307m^tPACid:19257967		
NGS-CR-1153418	-1.50367	clementine0.9_016492m^tPACid:19269757	AT1G75540.1	salt tolerance homolog2
NGS-CR-1165222	-1.51073	clementine0.9_005942m^tPACid:19282227	AT3G08510.1	phospholipase C 2
NGS-CR-1123639	-1.51262	clementine0.9_018367m^tPACid:19257779	AT4G21865.1	
NGS-CR-1178908	-1.51421	clementine0.9_002663m^tPACid:19254796	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1138017	-1.51713	clementine0.9_014563m^tPACid:19273292	AT5G11790.1	N-MYC downregulated-like 2
NGS-CR-1105739	-1.51758	clementine0.9_023790m^tPACid:19286300	AT1G31200.1	phloem protein 2-A9
NGS-CR-1112969	-1.52363	clementine0.9_005156m^tPACid:19270052	AT1G19715.3	Mannose-binding lectin superfamily protein
NGS-CR-1136157	-1.52559	clementine0.9_026296m^tPACid:19264794	AT2G30540.1	Thioredoxin superfamily protein
NGS-CR-1132039	-1.53243	clementine0.9_025053m^tPACid:19259495		
NGS-CR-1148992	-1.53372	clementine0.9_015606m^tPACid:19260601	AT5G19040.1	isopentenyltransferase 5
NGS-CR-1128789	-1.5409	clementine0.9_002010m^tPACid:19255980	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1165600	-1.54528	clementine0.9_023244m^tPACid:19272167	AT5G14670.1	ADP-ribosylation factor A1B
NGS-CR-1138528	-1.54635	clementine0.9_030553m^tPACid:19273191	AT5G25770.3	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
NGS-CR-1142887	-1.54709	clementine0.9_011078m^tPACid:19265554	AT4G31980.1	
NGS-CR-1101849	-1.54793	clementine0.9_004831m^tPACid:19268708	AT1G31770.1	ATP-binding cassette 14
NGS-CR-1165384	-1.55019	clementine0.9_024355m^tPACid:19268023	AT1G07400.1	HSP20-like chaperones superfamily protein
NGS-CR-1164791	-1.56168	clementine0.9_001457m^tPACid:19269785	AT1G75820.1	Leucine-rich receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1109246	-1.56511	clementine0.9_004467m^tPACid:19274543	AT3G18670.1	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1137759	-1.56913	clementine0.9_026615m^tPACid:19276212		
NGS-CR-1120768	-1.57918	clementine0.9_014542m^tPACid:19275208	AT3G07970.1	Pectin lyase-like superfamily protein
NGS-CR-1113353	-1.58891	clementine0.9_017355m^tPACid:19256673	AT3G04030.3	Homeodomain-like superfamily protein
NGS-CR-1124961	-1.59336	clementine0.9_008678m^tPACid:19279547	AT1G04680.1	Pectin lyase-like superfamily protein
NGS-CR-1146247	-1.6149	clementine0.9_018646m^tPACid:19285826	AT5G64240.2	metacaspase 3
NGS-CR-1136387	-1.63209	clementine0.9_026420m^tPACid:19272256	AT4G01710.1	ARP2/3 complex 16 kDa subunit (p16-Arc)
NGS-CR-1146247	-1.63325	clementine0.9_018646m^tPACid:19285826	AT5G64240.2	metacaspase 3
NGS-CR-1170120	-1.63358	clementine0.9_005333m^tPACid:19272630	AT3G42170.1	BED zinc finger ;hAT family dimerisation domain
NGS-CR-1152642	-1.64248	clementine0.9_009393m^tPACid:19266643	AT5G03910.1	ABC2 homolog 12
NGS-CR-1113357	-1.64938	clementine0.9_022484m^tPACid:19277590	AT5G25810.1	Integrase-type DNA-binding superfamily protein
NGS-CR-1125582	-1.65372	clementine0.9_009465m^tPACid:19258949	AT1G10740.1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
NGS-CR-1150096	-1.65537	clementine0.9_009903m^tPACid:19262853	AT3G13980.1	
NGS-CR-1124961	-1.68649	clementine0.9_008678m^tPACid:19279547	AT1G04680.1	Pectin lyase-like superfamily protein
NGS-CR-1181568	-1.68739	clementine0.9_027294m^tPACid:19281458		

Tabela S1. Parte 18

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	<sup>*</sup> Arabidopsis code	<sup>**</sup> Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1109246	-1.69384	clementine0.9_004467m^tPACid:19274543	AT3G18670.1	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1157866	-1.70138	clementine0.9_004341m^tPACid:19276125	AT5G48460.1	Actin binding Calponin homology (CH) domain-containing protei
NGS-CR-1144225	-1.71271	clementine0.9_001463m^tPACid:19286461	AT1G65780.1	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfam
NGS-CR-1106076	-1.71701	clementine0.9_024064m^tPACid:19284522	AT1G15380.1	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein
NGS-CR-1141810	-1.71988	clementine0.9_033620m^tPACid:19284807	AT1G75250.1	RAD-like 6
NGS-CR-1128308	-1.73073	clementine0.9_034635m^tPACid:19271954	AT4G38650.1	Glycosyl hydrolase family 10 protein
NGS-CR-1180142	-1.74731	clementine0.9_024402m^tPACid:19271336	AT4G21310.1	Protein of unknown function (DUF1218)
NGS-CR-1115421	-1.74879	clementine0.9_013738m^tPACid:19265293	AT3G30340.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
NGS-CR-1109246	-1.75275	clementine0.9_004467m^tPACid:19274543	AT3G18670.1	Ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1154427	-1.76905	clementine0.9_022858m^tPACid:19285053	AT2G03500.1	Homeodomain-like superfamily protein
NGS-CR-1100563	-1.77003	clementine0.9_023853m^tPACid:19251427	AT4G37445.1	
NGS-CR-1114568	-1.78162	clementine0.9_015956m^tPACid:19275456	AT1G79500.1	Aldolase-type TIM barrel family protein
NGS-CR-1155125	-1.78566	clementine0.9_009831m^tPACid:19282314	AT2G38170.3	cation exchanger 1
NGS-CR-1130566	-1.78886	clementine0.9_008774m^tPACid:19278645	AT1G59740.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1136162	-1.79195	clementine0.9_022200m^tPACid:19270818	AT1G29040.1	
NGS-CR-1124447	-1.79769e+308	clementine0.9_000044m^tPACid:19274355	AT1G80070.1	Pre-mRNA-processing-splicing factor
NGS-CR-1105032	-1.79769e+308	clementine0.9_005375m^tPACid:19287002	AT3G10050.1	L-O-methylthreonine resistant 1
NGS-CR-1116065	-1.80293	clementine0.9_008890m^tPACid:19279682	AT3G24530.1	AAA-type ATPase family protein / ankyrin repeat family protein
NGS-CR-1107814	-1.80326	clementine0.9_016110m^tPACid:19270920	AT1G05010.1	ethylene-forming enzyme
NGS-CR-1130566	-1.81828	clementine0.9_008774m^tPACid:19278645	AT1G59740.1	Major facilitator superfamily protein
NGS-CR-1122344	-1.82366	clementine0.9_030803m^tPACid:19264897	AT4G13780.1	methionine--tRNA ligase, putative / methionyl-tRNA synthetase,
NGS-CR-1107132	-1.83027	clementine0.9_001316m^tPACid:19276726	AT1G10390.1	Nucleoporin autopeptidase
NGS-CR-1148037	-1.8364	clementine0.9_031134m^tPACid:19278012	AT1G74190.1	receptor like protein 15
NGS-CR-1138653	-1.83768	clementine0.9_033420m^tPACid:19264780	AT3G30340.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
NGS-CR-1101849	-1.87185	clementine0.9_004831m^tPACid:19268708	AT1G31770.1	ATP-binding cassette 14
NGS-CR-1158335	-1.87473	clementine0.9_024699m^tPACid:19267828	AT2G40435.1	
NGS-CR-1148970	-1.88339	clementine0.9_034525m^tPACid:19271600	AT3G19550.1	
NGS-CR-1128789	-1.90754	clementine0.9_002010m^tPACid:19255980	AT4G08850.1	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein
NGS-CR-1147653	-1.91949	clementine0.9_021726m^tPACid:19253753	AT3G05327.1	Cyclin family protein
NGS-CR-1137564	-1.93243	clementine0.9_025507m^tPACid:19267877	AT3G56891.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
NGS-CR-1134633	-1.93452	clementine0.9_024305m^tPACid:19252574	AT4G26220.1	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfi
NGS-CR-1138846	-1.97721	clementine0.9_027091m^tPACid:19279222	AT1G06475.1	
NGS-CR-1147655	-1.98464	clementine0.9_028078m^tPACid:19252643	AT2G15680.1	Calcium-binding EF-hand family protein

Tabela S1. Parte 19

<sup>a</sup> id_CR05-C6_101	<sup>b</sup> ln(fold_change)	<sup>c</sup> id_Citrus clementine	*Arabidopsis code	**Products BLASTX against Arabidopsis
NGS-CR-1124070	-1.98584	clementine0.9_029744m^tPACid:19282409		
NGS-CR-1148146	-1.99214	clementine0.9_019191m^tPACid:19261197	AT2G39700.1	expansin A4
NGS-CR-1115681	-2.02386	clementine0.9_025380m^tPACid:19266867	AT5G01740.1	Nuclear transport factor 2 (NTF2) family protein
NGS-CR-1132824	-2.04021	clementine0.9_024686m^tPACid:19252718	AT2G23690.1	
NGS-CR-1101760	-2.05404	clementine0.9_023338m^tPACid:19276628	AT2G18196.1	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
NGS-CR-1106205	-2.08942	clementine0.9_024010m^tPACid:19271939	AT4G33720.1	CAP (Cysteine-rich secretory proteins
NGS-CR-1126524	-2.09575	clementine0.9_006559m^tPACid:19276260	AT2G32700.6	LEUNIG_homolog
NGS-CR-1112695	-2.15007	clementine0.9_018357m^tPACid:19262102	AT2G32070.1	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily pro
NGS-CR-1156460	-2.16047	clementine0.9_029887m^tPACid:19265679	AT4G31980.1	
NGS-CR-1106964	-2.16697	clementine0.9_019619m^tPACid:19262415	AT2G23970.1	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
NGS-CR-1137106	-2.23375	clementine0.9_008237m^tPACid:19284558	AT2G25737.1	Sulfite exporter TauE/SafE family protein
NGS-CR-1144590	-2.2367	clementine0.9_027273m^tPACid:19256735		
NGS-CR-1138653	-2.33998	clementine0.9_033420m^tPACid:19264780	AT3G30340.1	nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein
NGS-CR-1168724	-2.36764	clementine0.9_024909m^tPACid:19255958		
NGS-CR-1106964	-2.39755	clementine0.9_019619m^tPACid:19262415	AT2G23970.1	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein
NGS-CR-1144590	-2.49547	clementine0.9_027239m^tPACid:19256767		
NGS-CR-1146021	-2.57243	clementine0.9_008742m^tPACid:19251257	AT3G49900.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein
NGS-CR-1167672	-2.63233	clementine0.9_034998m^tPACid:19258782	AT3G47570.1	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
NGS-CR-1141722	-3.35441	clementine0.9_012078m^tPACid:19275861	AT4G10490.1	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfam

a. Identificação dos genes do transcriptoma de poncan infectada com *X. fastidiosa*

b. Nível de expressão relativa em tecidos xilemáticos de plantas infectadas (CR05-C6\_101) comparado com plantas não infectadas (CR05-C6\_100)

c. Identificação dos genes de *Citrus clementina* (genoma de referência utilizado na montagem da biblioteca)

\*<http://www.arabidopsis.org>

\*\*[http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/search\\_main\\_frame.html](http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB/search_main_frame.html)