

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**

**Avaliação do papel do receptor imunológico Bs4 do tomateiro no
reconhecimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Amanda Nicolau Minetto

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte
dos requisitos para obtenção do título de:
Bacharel em Ciências Biológicas

**Piracicaba, SP
2023**

Amanda Nicolau Minetto

**Avaliação do papel do receptor imunológico Bs4 do tomateiro no reconhecimento
da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri***

Orientador(a):

Prof. Dr. **PAULO JOSÉ PEREIRA LIMA TEIXEIRA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas

Piracicaba, SP

2023

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo (ESALQ - USP) pelos inestimáveis anos de aprendizado que me foram proporcionados. Em adição, estendo meus agradecimentos a toda a equipe do Laboratório de Genética e Imunologia de Plantas, localizado no Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC), onde dediquei meu esforço ao desenvolvimento do meu trabalho de conclusão de curso. Em particular, desejo expressar minha sincera apreciação ao meu orientador, Paulo José Pereira Lima Teixeira, cuja mestria profissional e excelência como educador foram evidentes ao longo de todos esses anos de colaboração em seu laboratório.

Expresso meus sinceros agradecimentos aos ilustres colaboradores externos deste estudo, notadamente ao Professor Thomas Lahaye, da Universidade de Tübingen (Alemanha), ao Dr. Jeff Jones, Universidade da Flórida (EUA) e ao Professor Celso Benedetti (Laboratório Nacional de Biociências - LNBio), cujas contribuições forneceram materiais de fundamental importância para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço profundamente aos membros da banca avaliadora por aceitarem o convite e dedicarem preciosos momentos de seu tempo para avaliar e aprimorar este trabalho por meio de *feedbacks* valiosos.

Não posso deixar de reconhecer o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2020/09372-1, pela concessão de bolsa no país e do Instituto Serrapilheira, cuja contribuição foi essencial para a realização deste trabalho. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e do Instituto Serrapilheira.

Sou grata a Deus por Sua benevolência ao conceder-me graça, saúde e capacitação ao longo da jornada acadêmica. Além disso, expresso minha profunda gratidão à minha família, alicerce fundamental durante toda a minha trajetória acadêmica. Em especial quero agradecer ao meu pai, Antonio Aparecido de Jesus Minetto, à minha mãe, Andrea Nicolau Minetto e ao meu irmão, João Pedro Nicolau Minetto, cujo apoio inabalável, encorajamento constante e amor incondicional foram elementos cruciais para a realização deste trabalho. A presença deles foi minha fonte de inspiração, e esta conquista é dedicada, em grande parte, à dedicação e apoio que recebi de cada um deles.

Por último, mas não menos importante, estendo meus agradecimentos às pessoas que conheci durante a graduação. Sem dúvida, esses cinco anos foram enriquecidos e tornados mais significativos pela presença de cada um de vocês.

EPÍGRAFE

“E vou aprendendo com as plantas que:
Por mais que na vida tenhamos que
enfrentar vários desertos, e as várias
pragas que só querem ver o nosso mal,
precisamos ter esperança em nossos
sonhos, seguir adubando e regando a
cada dia, pois para cada folha que cai
brotá uma mais forte e bonita.”

Felipe Santiago

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
1.1 O sistema Imune Vegetal	9
1.2 Reconhecimento de efetores por receptores NLR	11
1.3 A Importância do gênero <i>Xanthomonas</i> na agricultura	15
1.4 A NLR Bs4 de tomateiro reconhece efetores TAL de <i>Xanthomonas</i>	15
1.5 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 é reconhecida pelo tomateiro	17
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Materiais biológicos utilizados	19
3.1 Clonagem dos genes <i>PthAs</i> de <i>Xcc306</i>	19
3.1.1 PCR com enzima Q5 Polimerase (NEB)	20
3.2 Purificação de banda de gel de agarose	20
3.3 Reação BP (Clonagem <i>Gateway</i>)	21
3.4 Extração de DNA plasmidial e sequenciamento de DNA	21
3.5 Transformação de <i>E. coli</i> Top10 eletrocompetente	22
3.6 Reação LR (Clonagem <i>Gateway</i>)	22
3.7 Obtenção de sementes de <i>S. lycopersicum</i> mutante <i>bs4</i>	23
3.8 Screening de clones buscando pelo gene <i>Bs4</i>	23
3.8 Genotipagem de mutantes <i>bs4</i> do tomateiro cultivar <i>Money Maker</i>	25
3.9 Inoculação de mutantes de <i>Xcc306</i> em tomateiro mutante <i>bs4</i>	27
3.10 Medição de extravasamento de eletrólitos com tomateiro	28
3.11 Conjugação Triparental	29
4.12 Transformação de <i>Agrobacterium</i> com os genes <i>PthAs</i>	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Amplificação dos genes <i>PthAs</i>	31
4.2 Sequenciamento dos genes <i>PthAs</i>	33

4.3 Genotipagem dos tomateiros	35
4.4 Inoculação de tomateiro mutante bs4 com mutantes $\Delta PthA$ de <i>Xcc306</i>	37
4.5 Outros efetores de <i>Xanthomonas</i> são potencialmente reconhecidos pelo tomateiro	38
4.6 Quantificação do vazamento de eletrólitos durante HR em tomateiro	39
4.7 Expressão transiente de PthAs em tomateiros	43
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	46

RESUMO

Avaliação do papel do receptor imunológico Bs4 do tomateiro no reconhecimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O sistema imune vegetal é constituído por dois níveis de defesa baseados na ação combinada de receptores com variadas especificidades para o reconhecimento de patógenos e subsequente ativação de respostas bioquímicas. O primeiro nível de defesa depende de receptores transmembranares para o reconhecimento de moléculas extracelulares. O segundo nível é formado por receptores intracelulares denominados NLRs (*Nucleotide Binding–Leucine-Rich Repeat*) que reconhecem moléculas de patógenos no interior das células vegetais. Estas moléculas, na ausência de seus receptores cognatos, costumam ser efetores de virulência que contribuem para o estabelecimento da infecção. Em bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*, a classe de efetores TAL (*transcription activator-like*) desempenha um importante papel na colonização e adaptação ao hospedeiro. Tais efetores são capazes de se ligar ao DNA da planta em sítios específicos e ativar a transcrição de genes que irão facilitar a infecção. Recentemente, nosso laboratório verificou que ao menos um efetor da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (*Xcc306*), patogênica em citros, é reconhecido pelo sistema imune da planta não-hospedeira *Solanum lycopersicum* (tomateiro). Uma vez que esta planta carrega uma proteína NLR (denominada Bs4) capaz de reconhecer efetores TAL, este trabalho testou se o receptor Bs4 tem alguma participação na resposta imune do tomateiro contra *Xcc306*. Para isso, realizamos infiltrações em tomateiro selvagem e mutante *bs4* gerado por CRISPR/Cas9, o qual não apresenta o receptor Bs4 funcional. Utilizamos as bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem e a bactéria mutante *ΔPthA* com o propósito de investigar se o reconhecimento desse patógeno está exclusivamente vinculado ao reconhecimento das proteínas PthAs pelo receptor Bs4. Assim, esperamos determinar geneticamente o possível papel do receptor Bs4 no reconhecimento dos efetores TAL de *Xcc306*. Este trabalho apoiará o entendimento dos mecanismos de resistência de plantas não-hospedeiras contra *Xcc306*, podendo levar à identificação de um receptor imune com potencial de reconhecer esta bactéria.

Palavras-chave: Sistema Imune Vegetal, TIR-NLR Bs4, *Xanthomonas*, efetores TALs

ABSTRACT

Evaluation of the role of the bs4 immune receptor from tomato in the recognition of the bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citrus*

The plant immune system consists of two levels of defense based on the combined action of receptors with varied specificities for the recognition of pathogens and subsequent activation of biochemical responses. The first level of defense depends on transmembrane receptors for the recognition of extracellular molecules. The second level is formed by intracellular receptors called NLRs (Nucleotide Binding–Leucine-Rich Repeat) that recognize pathogen molecules inside plant cells. These molecules, in the absence of their cognate receptors, are usually virulence effectors that contribute to the establishment of infection. In phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas*, the TAL (*transcription activator-like*) plays an important role in colonization and adaptation to the host. Such effectors are capable of binding to the plant's DNA at specific sites and activating the transcription of genes that will facilitate infection. Recently, our laboratory verified that at least one effector of the bacteria *Xanthomonas citrus* subsp. *citri* 306 (*Xcc306*), pathogenic in citrus, is recognized by the immune system of the non-host plant *Solanum lycopersicum* (tomato). Since this plant carries an NLR protein (called Bs4) capable of recognizing TAL effectors, this work will test whether the Bs4 receptor has any role in the tomato immune response against *Xcc306*. For this purpose, we performed infiltrations in wild-type and *bs4* mutant tomato plants generated by CRISPR/Cas9, the latter of which lacks the functional Bs4 receptor. We employed the wild-type *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 bacteria and the mutant $\Delta PthA$ bacteria with the aim of investigating whether the recognition of this pathogen is exclusively linked to the recognition of PthA proteins by the Bs4 receptor. Thus, we hope to genetically determine the possible role of the Bs4 receptor in the recognition of the TAL effectors of *Xcc306*. This work will support the understanding of the resistance mechanisms of non-host plants against *Xcc306*, which may lead to the identification of an immune receptor with the potential to recognize this bacterium.

Keywords: Plant Immune System, TIR-NLR Bs4, *Xanthomonas* , TALs effectors

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema Imune Vegetal

O sistema imune vegetal dispõe de dois mecanismos de reconhecimento de patógenos. O primeiro deles é mediado por receptores transmembranares denominados *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), os quais reconhecem moléculas de microrganismos no meio extracelular. O segundo mecanismo de percepção dependente de receptores citoplasmáticos denominados *Nucleotide Binding Leucine-Rich Repeat* (NLRs), que são responsáveis pelo reconhecimento de moléculas efetoras no interior da célula vegetal (figura 1A) (JONES & DANGL, 2006). O reconhecimento por NLRs pode ser indireto, quando os receptores reconhecem a presença de patógenos por meio da atividade enzimática de moléculas efetoras capaz de modificar proteínas alvo na célula hospedeira, ou direto, quando as moléculas efetoras são reconhecidas por sua estrutura através da interação com o receptor (SAUR *et al.*, 2020).

A primeira camada de receptores (PRRs) é capaz de reconhecer padrões moleculares associados a microrganismos/patógenos (MAMPs/PAMPs; *Microbe/Pathogen – Associated Molecular Pattern*) que são, em geral, moléculas altamente conservadas em classes inteiras de microrganismos por desempenharem papéis indispensáveis. Exemplos bem caracterizados de MAMPs incluem a proteína flagelina do flagelo bacteriano e o carboidrato quitina da parede celular dos fungos (JONES & DANGL, 2006). O reconhecimento dessas moléculas por PRRs desencadeia uma resposta imunológica denominada *MAMP-triggered immunity* (MTI; também chamada de *PAMP-triggered immunity*–PTI), a qual é eficaz contra a maioria dos microrganismos não adaptados. A MTI compreende uma ampla gama de respostas, incluindo a rápida produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), a ativação de Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs) e a expressão de genes codificadores de proteínas antimicrobianas (MACHO *et al.*, 2014).

Por outro lado, patógenos adaptados utilizam moléculas denominadas efetores para auxiliar na colonização do tecido vegetal através da supressão da MTI. Esse processo é conhecido como susceptibilidade desencadeada por efetor (ETS; *effector-triggered susceptibility*). A célula hospedeira, por sua vez, utiliza a segunda camada de receptores para conter o avanço do patógeno.

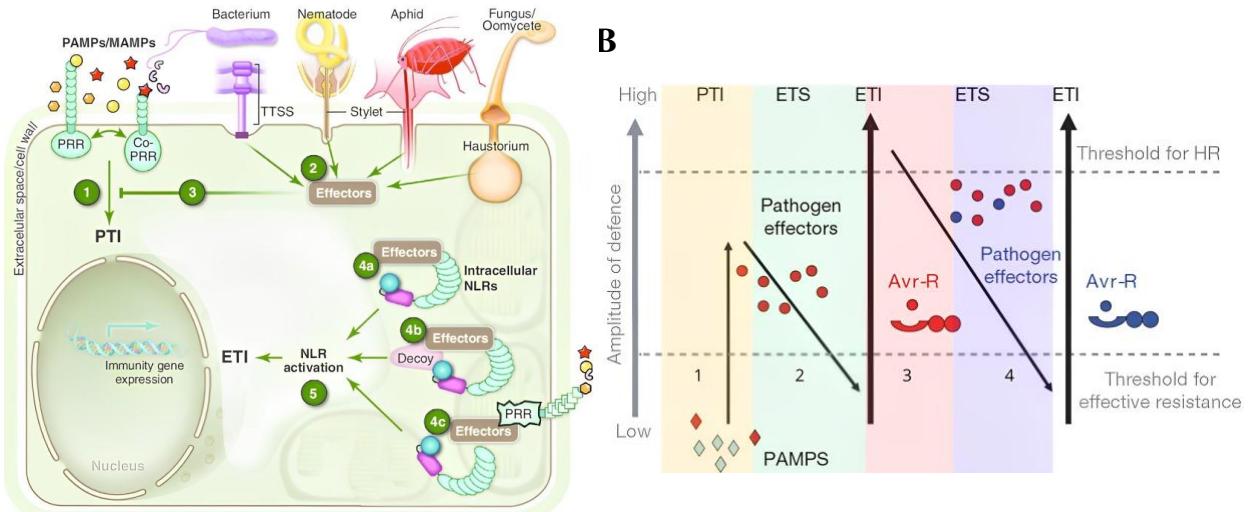


Figura 1. Representação do sistema imunológico de plantas e o modelo zigue-zague. (A) Patógenos e pragas de diferentes grupos filogenéticos expressam PAMPs/MAMPs durante a invasão do hospedeiro. As plantas percebem estas moléculas por meio de PRRs localizados na membrana plasmática e iniciam a imunidade mediada por PRR (PTI, também denominado de MTI; etapa 1). Os patógenos secretam efetores de virulência no apoplasto (não mostrado) ou então para o interior das células vegetais (etapa 2) para bloquear a percepção dos PAMPs/MAMPs. Esses efetores são direcionados para locais subcelulares específicos, onde podem suprimir a PTI e facilitar a virulência (etapa 3). Os receptores NLR intracelulares podem detectar efetores de três maneiras principais: primeiro, pela interação direta do ligante do receptor (etapa 4a); segundo, detectando alteração mediada por efetor em uma proteína isca que imita estruturalmente um alvo efetor, mas não tem outra função na célula vegetal (etapa 4b); e terceiro, detectando alteração mediada por efetor de um alvo de virulência do hospedeiro, como o domínio citosólico de uma PRR (etapa 4c). Ainda não está claro se cada um desses modos de ativação prossegue pelo mesmo mecanismo molecular, nem está claro como ou onde cada um deles resulta em imunidade desencadeada por efetor (ETI) dependente de NLR. Figura extraída de DANGL *et al.*, (2013). (B) O modelo zigue-zague ilustra a alternância entre susceptibilidade e resistência de plantas a patógenos ao longo do processo evolutivo. Neste esquema, o resultado da interação (resistência ou susceptibilidade) depende de componentes da planta e do patógeno. Na fase 1 (marcada de amarelo), as plantas detectam padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs, diamantes vermelhos) por meio de PRRs para induzir imunidade desencadeada por MAMPs (MTI). Na fase 2 (verde), os patógenos bem-sucedidos utilizam efetores que interferem na MTI, ou permitem a dispersão de patógenos, resultando em susceptibilidade desencadeada por efetor (ETS). Na fase 3 (vermelho), um efetor (indicado como um círculo vermelho) é reconhecido por uma proteína NLR (codificada por um gene *R*), ativando a imunidade desencadeada por efetor (ETI), uma versão amplificada da MTI que muitas vezes passa um limiar para indução da resposta de hipersensibilidade (HR; morte celular). Na fase 4 (violeta), são selecionados isolados de patógenos que perderam o efetor vermelho e talvez tenham ganhado novos efetores (círculo azul), que podem ajudar os patógenos a suprimir a ETI. A seleção favorece novos alelos NLR da planta que podem reconhecer um dos efetores recém-adquiridos, resultando novamente na ETI. Figura adaptada de JONES & DANGL (2006).

Esses receptores citoplasmáticos (NLRs) serão capazes de reconhecer moléculas efetoras provenientes de patógenos e irão desencadear uma resposta imunológica denominada Imunidade Desencadeada por Efetor (ETI; *effector-triggered immunity*), a qual é muito mais forte que a MTI e pode resultar em morte do tecido vegetal infectado (Resposta de Hipersensibilidade; HR), impedindo que o patógeno se espalhe por uma área maior (JONES & DANGL, 2006).

No processo evolutivo, a alternância entre ETI e ETS determina o resultado de interações planta-patógeno (resistência ou susceptibilidade) e, com base nessas interações, desenvolveu-se o modelo conhecido como “modelo zigue- zague” (figura 1B). Os patógenos continuam evoluindo, sofrendo mutações que levam à perda ou a alterações dos efetores já existentes, enquanto a seleção natural irá permitir o sucesso evolutivo dos mais adaptados. A seleção natural será a responsável por selecionar patógenos que carreguem efetores que não sejam reconhecidos pelo hospedeiro. De maneira similar, plantas que evoluem receptores (codificados por genes R) capazes de reconhecer efetores específicos podem ser selecionadas, de forma que, quanto maior for a gama de patógenos que ela consiga reconhecer, maior será a chance de ela sobreviver no ambiente e propagar seu precioso patrimônio gênico (MAYR, 1970). Essa constante corrida evolutiva pode ser explicada pela “Hipótese da Rainha Vermelha” de Leigh Van Valen em alusão à personagem do livro “Alice através do espelho”. Nele, a personagem Rainha Vermelha diz para Alice: *“It takes all the running you can do, to keep in the same place”* (“É preciso todo o esforço possível para permanecer no mesmo local”).

De acordo com essa hipótese, muito utilizada no estudo de interações ecológicas, existe uma constante corrida evolutiva entre hospedeiro e parasita, na qual ambos coevoluem de maneira que a competição se mantém estável. A hipótese da Rainha Vermelha prevê “Guerras Armamentistas”, com predadores se aprimorando para obter suas presas, e as presas por sua vez se aprimorando em escapar dos predadores; hospedeiros se esforçando para despistar seus parasitas e parasitas tentando constantemente enganar os sistemas de defesa dos hospedeiros (BIAZOLI JUNIOR *et al.*, 2020).

1.2 Reconhecimento de efetores por receptores NLR

Como já descrito acima, os NLRs são receptores citoplasmáticos capazes de reconhecer moléculas efetoras de diferentes patógenos através de interações específicas de forma direta (contato direto com o efetor) ou indireta (por reconhecer alguma atividade incomum na célula causada por ele, por exemplo, uma proteína da própria planta que foi fosforilada ou clivada).

Esse reconhecimento desencadeia, geralmente, uma resposta de hipersensibilidade (HR) (figura 2C), associada à morte celular programada (MONTEIRO & NISHIMURA, 2018).

Os NLRs possuem uma estrutura típica que consiste em uma região central contendo um Sítio de Ligação ao Nucleotídeo (NBS; *nucleotide-binding site*) juntamente com um domínio de oligomerização e uma Repetição Rica em Leucina (LRR) na região C-terminal responsável pela determinação do ligante (figura 2A). Além disso, NLRs possuem um domínio N-terminal variável, o qual pode ser um Receptor Toll interleucina-1 (TIR; *Toll-interleukin-1 receptor*), um domínio do tipo bobina enrolada (CC; *coiled-coil*) ou um domínio semelhante a HeLo (HET-S e LOPB), típico das recém-descritas *helper NLRs* (SAUR *et al.*, 2020). O domínio N-terminal é essencial e muitas vezes suficiente para desencadear a morte celular. Propõe-se que as proteínas NLRs funcionem como comutadores de múltiplos domínios com estados inativos e ativos impulsionados pelo estado ligado ao nucleotídeo do domínio central da NLR. Quando ligado a Adenosina Difosfato (ADP), o NLR se encontra em uma conformação fechada e inativa. Porém, o receptor assume uma conformação aberta e ativa ao ligar-se ao Trifosfato de Adenosina (ATP) (figura 2B) (MONTEIRO & NISHIMURA, 2018).

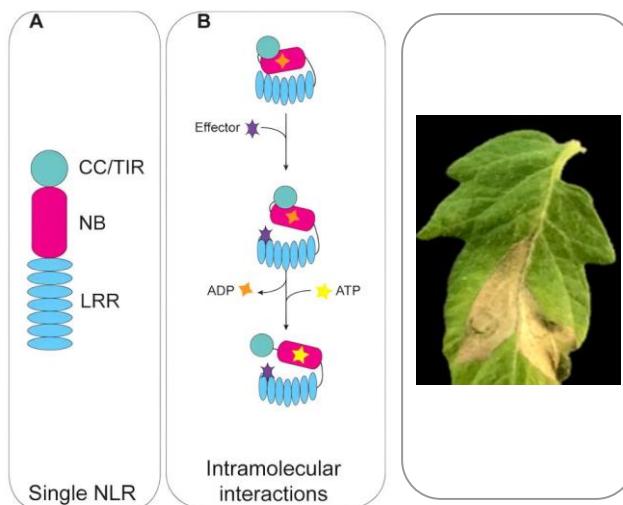


Figura 2. Representação de um receptor NLR típico de plantas. (A) Na parte superior, a região N-terminal contendo um domínio variável (CC/TIR), na região central o domínio NB (sítio de ligação ao nucleotídeo) e na parte inferior, o domínio LRR na região C-terminal. (B) Observa-se na parte superior da imagem a NLR em seu estado inativo ligada a um ADP. Quando o receptor entra em contato com o efetor, ocorre uma mudança na conformação do complexo resultando na liberação da molécula de ADP e ligação a uma molécula de ATP. Dessa forma, a proteína NLR agora se encontra em seu estado ativo. Figura extraída de BONARDI *et al.*, (2012) (C) Imagem representativa do fenótipo característico de HR (Resposta Hipersensível) desencadeada em tomateiro em virtude do reconhecimento da bactéria *Xcc306*.

Pouco ainda se sabe sobre como se dá a sinalização dos mecanismos de defesa e indução da morte celular após ativação de um receptor NLR. Recentemente, descobriu-se que o receptor CC-NLR ZAR1 de *Arabidopsis thaliana*, quando ativado pelo efetor AvrAC da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, sofre uma notável remodelação estrutural: cinco moléculas do receptor se oligomerizam em um resistossomo do tipo roda pentamérica após a substituição de difosfato de adenosina (ADP) por trifosfato de adenosina ou trifosfato de desoxiadenosina ((d)ATP) na região de ligação de nucleotídeos do domínio NB (figura 3). Essa modificação estrutural projeta alfa-hélices dos domínios CC para fora do plano deste pentâmero, formando um “funil” que perfura a membrana plasmática de dentro para fora, causando a morte celular e consequente resistência ao patógeno (DANGL; JONES, 2019; WANG *et al.*, 2019). Já existem estudos que buscam descobrir se os demais CC-NLRs funcionam de forma similar a ZAR1 (ADACHI *et al.*, 2019; BAI *et al.*, 2012; CASEY *et al.*, 2016; FÖRDERER; KOURELIS, 2023; WANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2022)

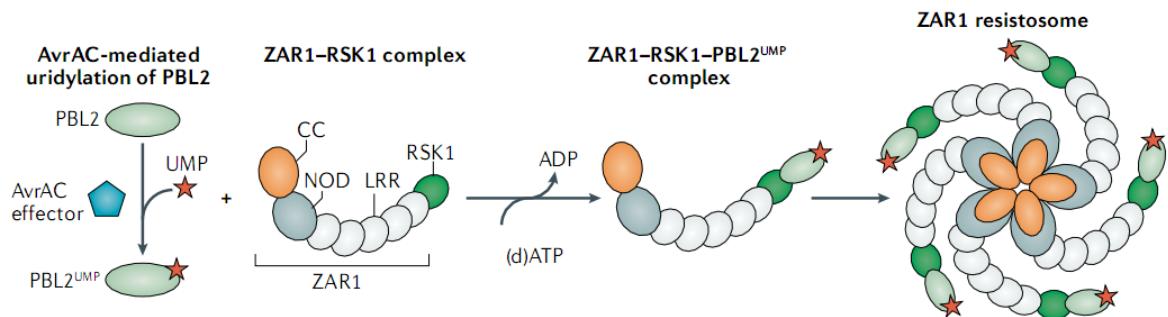


Figura 3. Representação esquemática da formação do resistossomo ZAR1. O efetor de *Xanthomonas* AvrAC uridila a quinase PBL2 de *Arabidopsis thaliana*. PBL2 uridilado (PBL2UMP) associa-se à pseudoquinase RSK1 de *A. thaliana* ligada ao receptor de oligomerização de ligação ao nucleotídeo (domínio NB) (NLR) de ZAR1. Isso leva a uma mudança conformacional do receptor (não mostrado) e substituição de difosfato de adenosina (ADP) por trifosfato de adenosina ou trifosfato de desoxiadenosina ((d)ATP) na bolsa de ligação de nucleotídeos do NOD de ZAR1. Em última instância, isso resulta na formação de um resistossomo ZAR1 do tipo roda pentamérica, que é composto por cinco protômeros ZAR1 – RSK1 – PBL2UMP com os domínios CC formando uma estrutura central (em laranja). Essa estrutura similar a um funil perfura a membrana plasmática da célula vegetal, induzindo a sua morte. Figura extraída de SAUR *et al.* (2020).

Por outro lado, a ativação de TIR-NLRs leva à formação de uma estrutura TIR tetramérica (figura 4) com atividade de nicotinamida adenina dinucleotídeoglicohidrolase (NADase), o que resulta na formação de ribose de difosfato de adenosina (ADPR) ou uma variante de ADPR cíclico (v-cADPR) (BAYLESS *et al.*, 2020; SAUR *et al.*, 2020). Essa atividade enzimática é

ativada pelo reconhecimento de patógenos. Ainda não está claro como a atividade de NADase de TIR-NLRs se relaciona com a morte celular observada após a ativação destes receptores (WAN *et al.*, 2019). Estudos recentes têm demonstrado que os domínios TIR desempenham uma série de atividades enzimáticas adicionais que regulam a imunidade vegetal. Essas atividades enzimáticas realizam a quebra de NAD⁺, ATP e outros ácidos nucléicos, gerando metabólitos de nucleotídeos estruturalmente diversificados que podem atuar como mensageiros para induzir a imunidade da planta. Além da hidrólise de NAD⁺, proteínas com domínio TIR, como a *Arabidopsis TIR-only Response to HopBA1* (RBA1), também têm a atividade de degradar ácidos nucleicos, particularmente dsRNA, resultando na geração de 2',3'-cAMP/cGMP, os quais parecem ter um papel importante na resposta imune mediada por RBA1, regulando a expressão de genes necessários para a sinalização de EDS1 (JIA *et al.*, 2023).

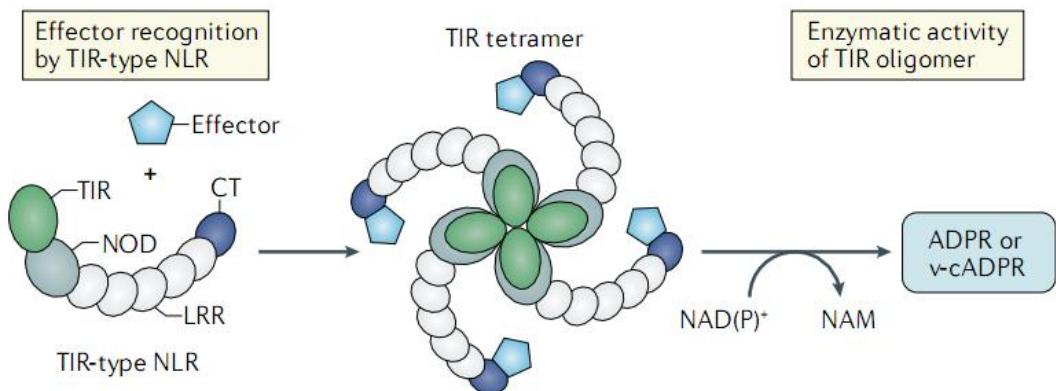


Figura 4. Formação do resistossomo de TIR-NLRs tetramérico. O reconhecimento direto de um efetor de avirulência do patógeno pela repetição rica em leucina (LRR) e domínios carboxi-terminal (CT) de um domínio do receptor canônico de Toll / interleucina-1 (TIR) contendo o domínio de oligomerização de ligação aos nucleotídeos (NB) como o receptor (TIR- tipo NLR) leva à formação de uma estrutura TIR tetramérica com atividade de nicotinamida adenina dinucleotídeo glicohidrolase (NADase). Isso resulta na formação de ribose de difosfato de adenosina (ADPR) ou uma variante de ADPR cíclico (v-cADPR), que parecem funcionar como sinalizadores no sistema imune vegetal. Figura extraída de SAUR *et al.* (2020)

Notavelmente, as diferentes classes de NLRs (TIR-NLR e CC-NLR) apresentam requerimentos genéticos distintos para seu funcionamento, indicando que atuam por mecanismos moleculares diferentes. Alguns genes são necessários para ambas as classes de receptores, como aqueles que codificam as chaperonas e co-chaperonas Hsp90, SGT1 e RAR1. Por outro lado, membros da família do gene do tipo lipase chamado EDS1 são essenciais para o funcionamento de TIR-NLRs (PARKER *et al.*, 2022), ao passo que muitos CC-NLRs são dependentes da função de NDR1, uma proteína com homologia com

integrinas (MONTEIRO & NISHIMURA, 2018). A função precisa destes componentes na ativação de NLRs é ainda desconhecida.

1.3 A Importância do gênero *Xanthomonas* na agricultura

O gênero *Xanthomonas* constitui-se num dos mais importantes gêneros de patógenos bacterianos que afetam a agricultura, atacando principalmente a parte aérea de diversas espécies de plantas de importância econômica (MARCUZZO, 2009). Várias espécies desse gênero já afetaram severamente plantações de arroz na Ásia e causaram grandes danos econômicos na indústria cítrica dos Estados Unidos e Brasil, além de prejudicar plantações de mandioca, pimenta, soja, tomate, manga, nozes, entre outras no mundo todo (SCHORNACK *et al.*, 2013).

O cancro cítrico, por exemplo, é resultado da interação compatível entre a bactéria *Xanthomonas citri* e *Citrus spp*. Os principais sintomas dessa doença, decorrentes dos processos de hipertrofia (aumento do volume celular) e hiperplasia (aumento da divisão celular), são dependentes da proteína efetora PthA4 de *X. citri*. Essa proteína integra a família de fatores de transcrição conhecida como efetores ativadores de transcrição (*transcription activator-like* ou TAL) (PEREIRA, 2011). O primeiro relato de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* no estado de São Paulo foi em 1957. A ocorrência dessa bactéria também foi registrada no Paraná no mesmo ano. Esses eventos fizeram com que algumas regiões fossem impedidas de cultivar citros por mais de 30 anos, sendo que a sua liberação foi realizada associada a várias medidas de manejo integrado da doença no final da década de 1980 (VARGAS *et al.*, 2013). Além disso, em decorrência da suspensão do programa de erradicação e a implementação do sistema de mitigação de riscos, observou-se um aumento da disseminação do cancro cítrico e estima-se que a doença estará presente em 100% dos talhões citrícolas até 2029 (BEHLAU, 2020).

1.4 A NLR Bs4 de tomateiro reconhece efetores TAL de *Xanthomonas*

A proteína TIR-NLR codificada pelo gene *Bs4* em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) atua no reconhecimento de efetores do tipo Ativadores de Transcrição (TAL; *Transcription activator-like*). Os efetores TAL são codificados por bactérias patogênicas de plantas dos gêneros *Xanthomonas*, *Ralstonia* e *Burkholderia*, e induzem a expressão de genes do hospedeiro que irão facilitar a virulência, como genes de transportadores de açúcares (SCHORNACK *et al.*, 2013). Esses efetores são injetados no citoplasma da célula hospedeira pelo sistema de secreção do tipo III bacteriano e, uma vez no núcleo, são

capazes de se ligar a promotores específicos no genoma do hospedeiro de forma a ativar a transcrição dos chamados genes de susceptibilidade (BOGDANOVA *et al.*, 2010).

A estrutura de um efetor TAL típico consiste em três partes principais (SCHORNACK *et al.*, 2013): (1) a porção N-terminal responsável pela secreção e translocação do efetor para o interior da célula do hospedeiro; (2) uma sequência de resíduos de aminoácidos repetitiva e variável que determina a especificidade do efetor (a sequência de DNA ao qual ele se liga); (3) a região C-terminal, que contém a sequência de localização nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) e o domínio de ativação da transcrição.

As plantas, por sua vez, pressionadas pela seleção natural no decorrer do processo evolutivo, desenvolveram formas de identificar e combater esses efetores se utilizando de ao menos três mecanismos diferentes: (I) mutação nos promotores ou na maquinaria de transcrição de forma a impedir a interação dos mesmos com o efetor TAL, o que impede a ativação de genes de susceptibilidade; (II) uso de um “promotor armadilha”, o qual, ao ser ativado por um efetor TAL, transcreve um gene de resistência (executor) que compromete o estabelecimento da infecção pelo patógeno; (III) uso de NLRs capazes de reconhecer efetores TAL (SCHORNACK *et al.*, 2013).

O gene de resistência *Bs4* do tomateiro codifica um receptor do tipo TIR-NLR capaz de reconhecer o efetor TAL *avrBs4* presente em algumas estirpes de *Xanthomonas euvesicatoria*, causando HR e levando à resistência (SCHORNACK *et al.*, 2004). Estirpes desta bactéria que carregam o efetor TAL *avrBs3*, ao invés de *avrBs4*, não são reconhecidas pelo receptor *Bs4* e, portanto, estabelecem uma interação compatível com a planta. Curiosamente, as sequências de aminoácidos de *avrBs4* e *avrBs3* são 97% idênticas, indicando que poucas alterações na estrutura do efetor podem influenciar seu reconhecimento por *Bs4*. Ainda assim, o nível de expressão do efetor é determinante para seu reconhecimento, uma vez que *avrBs3* passa a ser reconhecido por *Bs4* quando presente em altos níveis na célula vegetal por meio de superexpressão (SCHORNACK *et al.*, 2004; SCHORNACK *et al.*, 2005).

1.5 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 é reconhecida pelo tomateiro

Experimentos realizados em nosso laboratório revelaram que tomateiro inoculado com *Xcc306* (*Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306) apresenta uma rápida HR (com clara morte celular), que não ocorre em plantas inoculadas com o mutante *ΔhrpB2*. HrpB2 é uma proteína necessária para o transporte de efetores da bactéria para dentro da célula vegetal através do sistema de secreção do tipo III (ROSSIER *et al.*, 2002). Assim, a inexistência de HR em plantas inoculadas com esse mutante indica que o reconhecimento de *Xcc306* pelo tomateiro requer a presença de efetores no interior da célula vegetal, sugerindo o envolvimento de receptores NLR (figura 5). Neste contexto, nosso grupo tem investigado quais dos 29 efetores identificados em *Xcc306* são reconhecidos pelo tomateiro através da inoculação de cada um deles nas folhas desta planta. Uma vez que esta bactéria carrega quatro efetores TAL (denominados PthA 1 a 4), pressupomos que o receptor Bs4 do tomateiro desempenhe um papel no reconhecimento e ativação de uma resposta imune efetiva contra *Xcc306*. Assim, este trabalho visou verificar se o receptor TIR-NLR Bs4 é, de fato, capaz de reconhecer algum dos efetores TAL de *Xcc306*, fazendo parte de uma iniciativa maior em nosso grupo que busca entender os mecanismos de determinam a incompatibilidade entre *Xcc306* e plantas não-hospedeiras.

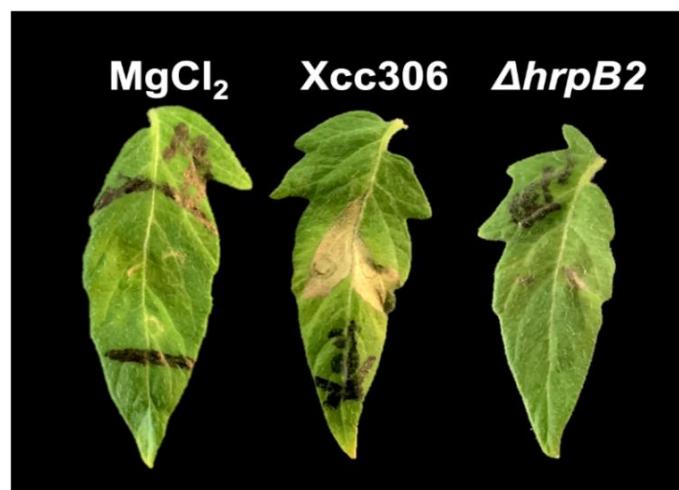


Figura 5. Inoculação de tomateiro com *Xcc306* resulta em HR. À esquerda, uma folha de tomateiro (cultivar FL8000) que foi inoculada com $MgCl_2$ (veículo da bactéria) como controle do experimento. No centro, observa-se HR na região inoculada com *Xcc306*, indicando o reconhecimento do patógeno pelo sistema imune da planta. À direita, uma folha que foi inoculada com o mutante *ΔhrpB2*, que é incapaz de injetar efetores no interior da célula vegetal, indicando que NLRs participam do reconhecimento de *Xcc306* por esta planta.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que o reconhecimento da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (*Xcc306*) depende do receptor Bs4 presente no tomateiro domesticado (*Solanum lycopersicum*) ou de pelo menos um dos quatro efetores TAL (PthAs) da bactéria *Xcc306*, sendo dividido em três objetivos específicos:

- Infiltrar tomateiro selvagem e mutante *bs4* com *Xccc306* selvagem e mutante $\Delta PthA$;
- Avaliar se o tomateiro perde a capacidade de reconhecer a *Xcc306* na ausência do receptor Bs4 e/ou dos efetores PthAs;
- Estabelecer um método para quantificar a HR observada durante os experimentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais biológicos utilizados

O cultivar *Money Maker* do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) e seu mutante para o gene *Bs4* foram utilizados nos experimentos. Esse mutante foi gerado por CRISPR/Cas9 e foi obtido através de uma colaboração com o Prof. Thomas Lahaye (Universidade de Tübingen, Alemanha). Ambos foram cultivados em uma casa de vegetação localizada na ESALQ/USP.

As bactérias utilizadas nos experimentos foram *Xcc306* selvagem, o mutante *ΔhrpB2* e o mutante *ΔPthA*. Esta última cepa teve seus quatro genes *PthA* deletados e foi gentilmente cedida pelo Dr. Jeff Jones (*University of Florida*). As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e o antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/µL, com exceção da mutante *ΔPthA*, que foi plaqueado em meio de cultura LB sólido contendo antibiótico rifampicina na concentração de 100 µg/µL. Todas as cepas foram armazenadas a -80°C em estoques de glicerol 16%.

3.1 Clonagem dos genes *PthAs* de *Xcc306*

Cada um dos quatro genes *PthA* foram amplificados a partir de fragmentos previamente isolados no vetor pBI121 (DOMINGUES, 2011), os quais foram gentilmente cedidos pelo Prof. Celso Benedetti (Laboratório Nacional de Biociências - LNBio). Uma vez que os quatro efetores apresentam alto grau de identidade em suas sequências de nucleotídeos, foi possível utilizar os mesmos *primers* (*forward* e *reverse*) em todas as reações (Tabela 1).

Os *primers* foram desenhados em colaboração com o aluno de Iniciação Científica do nosso laboratório Caio Vinícius Cardoso Mendes, que utilizou o aplicativo SnapGene para análises *in silico* de sequências, incluindo a simulação das clonagens e o desenho de *primers* e plasmídeos destinados à amplificação e sequenciamento dos genes de interesse.

Tabela 1. Sequência dos *primers* (*forward* e *reverse*) utilizados na amplificação dos genes *PthAs*. As sequências em vermelho (fragmentos attB1 e attB2 para *primers forward* (F) e *reverse* (R), respectivamente) foram introduzidas aos *primers* por serem responsáveis pela ligação do inserto de interesse aos plasmídeos de destino por meio de clonagem *Gateway*.

Primer	Gene(s) de interesse	Sequência do <i>Primer</i>
PJT667	<i>PthA1,2,3,4</i>	GGGGACAAGTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGATCCCATTGTTCG
PJT720	<i>PthA1,2,3,4</i>	GGGGACCACTTGTACAAGAAAGCTGGGTACTGAGGCAATAGCTCCA

3.1.1 PCR com enzima Q5 Polimerase (NEB)

Na primeira tentativa de amplificação dos genes *PthA* por PCR que realizamos, utilizamos a enzima Q5 DNA Polimerase (NEB) em reações com a seguinte composição:

- 5 μ L do tampão de reação para Q5 DNA Polimerase buffer 5X
- 0.2 μ L de dNTP 25mM
- 2.5 μ L do *primer forward* 5 μ M
- 2.5 μ L do *primer reverse* 5 μ M
- 0.25 μ L da enzima Q5 DNA Polimerase (NEB)
- 13.55 μ L de H₂O *Milli-Q*

As reações foram realizadas em tubos de 0.2 mL contendo 24 μ L deste *mix*. Em quatro destes tubos, adicionamos 1 μ L do vetor pBI121 (aproximadamente 10 ng) contendo um dos genes *PthA*. No quinto tubo, foi adicionado 1 μ L de H₂O *Milli-Q* como controle negativo para as amplificações. Esse material foi submetido às condições descritas na tabela 2 em um termociclador.

Tabela 2. Programa do termociclador para reação PCR utilizando a enzima Q5 polimerase na amplificação dos genes *PthAs*. Este PCR foi submetido a trinta ciclos de amplificação.

Temperatura	Tempo
98°C	30 segundos
98°C	10 segundos
60°C	30 segundos
72°C	2 minutos
72°C	2 minutos
4°C	∞

3.2 Purificação de banda de gel de agarose

Para a purificação da banda de gel de agarose contendo o resultado da amplificação por PCR dos genes *PthA*, nós primeiramente recortamos as bandas de interesse que continham os respectivos genes e pesamos cada uma delas em uma balança de precisão. Após as bandas serem dissolvidas em tampão *QG Solubilization buffer* (Qiagen), foi adicionado isopropanol ao tubo de 1,5mL e misturado por inversão suave. O material foi então passado para tubos contendo

uma coluna com membrana de sílica, os quais foram centrifugados por 1 minuto à velocidade máxima. O material que passou pela coluna foi descartado e tampão PE (Qiagen) foi adicionado à coluna. Depois de centrifugá-los por mais 1 minuto e passado o tubo com coluna para outro tubo de 1,5mL estéril, o DNA purificado foi eluído em 30µL de H₂O *Milli-Q*.

3.3 Reação BP (Clonagem *Gateway*)

As amostras resultantes da purificação de banda dos produtos de PCR foram concentradas a 50 ng/µL em um concentrador e utilizadas na reação de clonagem BP *Gateway*. Em um tubo de 0,2 mL foram adicionados 1 µL do vetor de entrada pDONR207 a 125 ng/µL, 3µL da amostra purificada a 50 ng/µL e 1 µL de enzima BP clonase II. Após incubação dos tubos por 1 hora a 25°C, foi adicionado a cada um deles 0,5 µL da enzima Proteinase K conforme instruções do fabricante. Os tubos foram incubados a 37°C por 10 minutos. Na sequência, fizemos a transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* da cepa Top10 por eletroporação com 3 µL do produto da reação BP. Estas células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB com 50 µg/mL do antibiótico Gentamicina.

3.4 Extração de DNA plasmidial e sequenciamento de DNA

Depois de plaqueadas, as bactérias transformadas foram inoculadas em meio líquido (5 mL de LB contendo 50 µg/mL de gentamicina). No dia seguinte, as células foram centrifugadas para realizarmos a extração de DNA plasmidial. Para isso, as células foram ressuspensas em 300 µL de solução P1 (Tris-HCl pH 8 50 mM; EDTA pH 8 10 mM; RNAase A 100 µg/mL). Então, 300 µL de solução P2 (SDS 5%, NaOH 10 M e H₂O *Milli-Q*) foram adicionados em sequência. Após 5 minutos, foram adicionados 300 µL da solução P3 (acetato de potássio pH 5,5 3M) e o tubo foi incubado por mais 5 minutos na bancada. Após a incubação, os tubos foram centrifugados à velocidade máxima por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e passado para um tubo novo. A precipitação do DNA foi realizada através da adição de 400 µL de isopropanol. Na sequência, o tubo foi centrifugado por 10 minutos e 500 µL de etanol 70% foram adicionados. Depois de nova centrifugação à velocidade máxima por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e mantido aberto na bancada até a completa evaporação do etanol. O DNA plasmidial então foi ressuspensido em 20 µL de H₂O *Milli-Q*. As concentrações de DNA obtidas por amostra foram medidas no espectrofotômetro Nanodrop One. As amostras tiveram suas concentrações ajustadas para cerca de 150 ng/µL para serem enviadas para o sequenciamento Sanger.

3.5 Transformação de *E. coli* Top10 eletrocompetente

Recebemos um material relevante para nosso trabalho através da colaboração do Prof. Thomas Lahaye (Universidade de Tübingen, Alemanha). Como os genes *PthAs* são grandes, apresentam uma alta taxa de conteúdo GC e grande quantidade de sequências repetitivas, tivemos dificuldades para sequenciá-los por completo utilizando o método de Sanger após introduzi-los no plasmídeo pDONOR207. Dessa forma, optamos por dar prosseguimento ao procedimento utilizando plasmídeos enviados pelo Prof. Thomas Lahaye, os quais já estavam confirmadamente carregando nossos genes de interesse. Inicialmente, realizamos a transformação por eletroporação das células eletrocompetentes de *E. coli* da cepa Top10. Para isso, inserimos em uma cubeta de eletroporação 40 µL de células eletrocompetentes e 1 µL do vetor de entrada pENTR carregando o gene de interesse. Após a descarga elétrica, foram adicionados 1000 µL de meio líquido LB na cubeta e todo material foi transferido para tubos de 1,5mL, os quais foram incubados a 37°C por 1 hora. Ao final desse período, o conteúdo dos tubos foi centrifugado, 900 µL do sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas nos 100 µL restantes. Estes 100 µL foram plaqueados em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e antibiótico canamicina na concentração de 30 ng/µL. Na sequência, foi extraído DNA plasmidial das células e as amostras foram preparadas e enviadas para o sequenciamento Sanger.

3.6 Reação LR (Clonagem Gateway)

Depois de sequenciadas, as amostras contendo DNA plasmidial das células de *E. coli* transformadas foram utilizadas em reações LR de clonagem *Gateway*. Em um tubo de 0,2 mL, foram adicionados 150 ng do vetor de entrada pENTR carregando os insertos de interesse, 170 ng do vetor de expressão pGWB614 e 1 µL de enzima LR clonase II. Após incubação dos tubos por 1 hora a 25°C, foi adicionado a cada um deles 0,5 µL da enzima Proteinase K. Os tubos foram incubados a 37°C por 10 minutos. Na sequência, fizemos a transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* da cepa Top10 por eletroporação com 1µL do produto da reação LR. Estas células foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio LB com o antibiótico espechinomicina a 50µg/mL.

Depois de plaqueadas, as bactérias transformadas foram inoculadas em meio líquido (5 mL de LB contendo 5 µL de espechinomicina) para serem utilizadas no processo de extração de DNA plasmidial seguindo o protocolo descrito no item 4.4. Após ressuspender o DNA plasmidial em 20µL de H₂O *Milli-Q*, as amostras tiveram suas concentrações medidas no

espectrofotômetro Nanodrop One. Em seguida, essas amostras foram preparadas e enviadas para o sequenciamento Sanger.

3.7 Obtenção de sementes de *S. lycopersicum* mutante *bs4*

Os tomateiros mutantes *bs4* obtidos por CRISPR/Cas9 foram cultivados em uma casa de vegetação localizada na ESALQ/USP até que produzissem frutos para que fosse realizada a extração das sementes. Cada tomateiro foi numerado e as respectivas sementes de cada planta foram armazenadas em recipientes separados a fim de evitar que elas fossem misturadas caso alguma planta não apresente o genótipo esperado após a genotipagem. Para a coleta das sementes, os frutos foram cortados em quatro partes, a polpa de cada um deles foi posta sobre uma peneira para serem lavadas, restando apenas as sementes sob a peneira. Essas sementes foram mergulhadas em uma solução de 10% de fosfato de sódio tribásico dodecahidratado por dez minutos, depois lavadas com água corrente e colocadas entre folhas de papel toalha para secagem. Depois de seis dias secando, as sementes foram colocadas em tubos separados. Para a genotipagem, cada planta teve o DNA genômico extraído a partir de uma amostra de folha.

3.8 Screening de clones buscando pelo gene *Bs4*

Trabalhamos também na amplificação do gene *Bs4* de tomateiro por meio de reações PCR, porém não obtivemos sucesso ao utilizar DNA genômico ou cDNA de *S. lycopersicum* nesse procedimento. Contudo, nosso laboratório obteve acesso a plasmídeos pENTR (vetor de entrada) carregando os genes *PthA1*, *PthA2*, *PthA3*, *PthA4*, *AvrBs4* e *Bs4* e a plasmídeos pDSK602 (vetor de expressão) carregando os genes *PthA1*, *PthA3* e *PthA4* através da colaboração do Prof. Thomas Lahaye (Universidade de Tübingen, Alemanha). Após receber o vetor de entrada pENTR carregando o gene *Bs4*, nós transformamos bactérias *E. coli* da cepa Top10 por meio de eletroporação. O próximo passo então foi extraír o DNA plasmidial e enviar para o sequenciamento Sanger. Ao observar os resultados, notamos que havia realmente um trecho do gene *Bs4* presente, porém havia sequências de DNA de *E. coli* intercaladas, mostrando que alguns clones eram quimeras. Repetimos então o processo de transformação e plaqueamento. Foram selecionadas 25 colônias para serem inoculadas em meio de cultura líquido, das quais 20 cresceram em um período de 24 horas. Foi feita extração de DNA plasmidial de todas elas e as amostras tiveram suas concentrações medidas no espectrofotômetro Nanodrop One. Na sequência, essas 20 amostras e as 4 que haviam sido extraídas anteriormente foram usadas em uma reação PCR em conjunto com *primers* internos do gene *Bs4* (Tabela 3; Figura 6) para identificar quais deles estariam carregando uma sequência

interna compatível com o gene de interesse, ao invés de conter uma sequência advinda de *E. coli*.

Tabela 3: Sequência dos *primers* internos (*forward* e *reverse*) utilizados na amplificação do fragmento do gene *Bs4*.

Primer	Gene(s) de interesse	Sequência do Primer
PJT735	<i>Bs4</i>	5' TACCCAACTCATCTCAC 3'
PJT736	<i>Bs4</i>	5' CCAAGTTTCTAAATCACCAA 3'

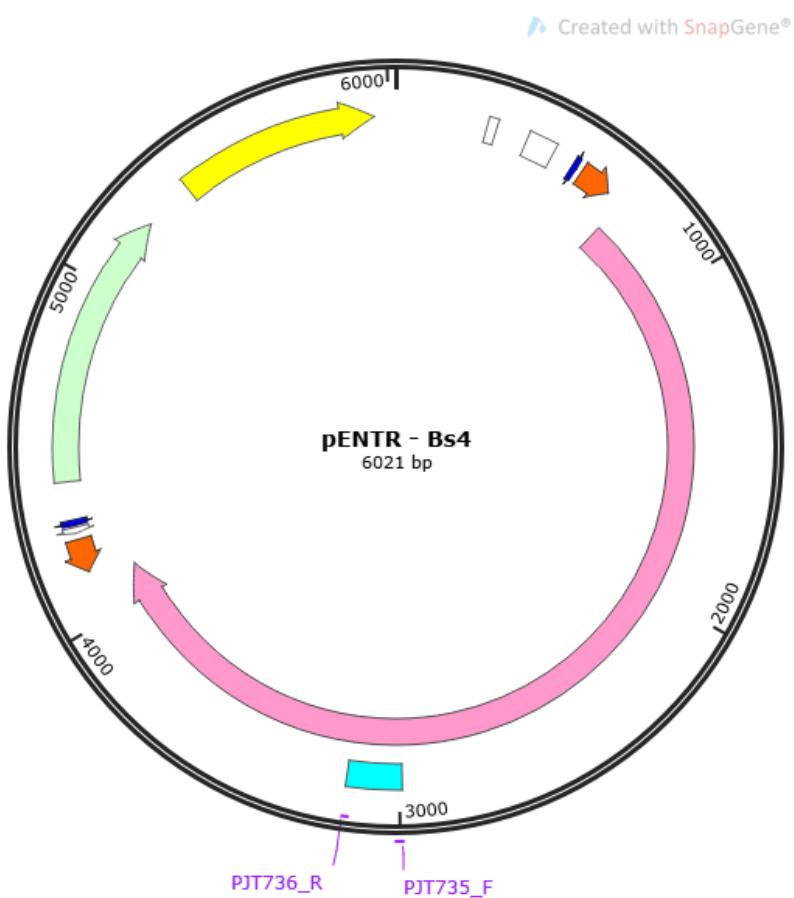


Figura 6. Representação esquemática no aplicativo SnapGene, destacando a região alvo para amplificação durante o rastreamento do gene *Bs4*. A CDS (*Coding Sequence*) do gene *Bs4* é identificada pelo segmento de coloração rosa, o qual está flanqueado pelas extremidades attL1 e attL2 (fragmentos de coloração laranja). Os *primers forward* e *reverse* (PJT735 e PJT736, respectivamente) foram empregados nas reações de PCR para a amplificação do fragmento interno do gene *Bs4*, abrangendo 160 pares de base (indicado pelo trecho ciano entre os primers). O fragmento verde denota o gene de resistência à canamicina, enquanto o fragmento amarelo indica a região de origem de replicação.

Para o PCR, utilizamos a enzima Q5 DNA Polimerase (NEB) em reações com a seguinte composição:

- 5 μ L do tampão de reação para Q5 DNA Polimerase buffer 5X
- 0.2 μ L de dNTP 25mM
- 2.5 μ L do *primer forward* 5 μ M (PJT735)
- 2.5 μ L do *primer reverse* 5 μ M (PJT736)
- 0.25 μ L da enzima Q5 DNA Polimerase (NEB)
- 13.55 μ L de H₂O *Milli-Q*

As reações foram realizadas em tubos de 0.2 mL contendo 24 μ L deste *mix*. Adicionamos 1 μ L do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas que cresceram na placa de Petri (aproximadamente 10 ng de DNA). Em um dos tubos foi adicionado 1 μ L de H₂O *Milli-Q* como controle negativo para as amplificações. Para o controle positivo, utilizamos DNA genômico extraído do tomateiro cultivar FL8000 e DNA genômico extraído do tomateiro cultivar Money Maker. Esse material foi submetido às mesmas condições descritas na tabela 2 em um termociclador, porém foram rodados 40 ciclos ao invés de 30. O resultado das reações de PCR foi avaliado em gel de agarose 1%.

3.8 Genotipagem de mutantes *bs4* do tomateiro cultivar *Money Maker*

Através de uma colaboração com o Prof. Thomas Lahaye (Universidade de Tübingen, Alemanha), obtivemos plantas mutantes para o gene *Bs4*, as quais foram geradas por CRISPR/Cas9. Para genotipar os tomateiros, foram utilizados os *primers* PJT923, PJT924 e PJT925 (Tabela 4). O mutante *bs4* apresenta uma deleção de 569 pares de bases no gene *Bs4*, inabilitando a funcionalidade do receptor que seria codificado por ele. Inicialmente tentamos realizar a PCR utilizando a enzima GoTaq (Promega), porém nenhuma banda foi observada no gel. Também utilizamos outros *primers* que já haviam sido testados para analisar se os *primers* novos seriam o motivo da falha na amplificação, mas também não observamos banda. Por fim, realizamos as reações utilizando a enzima Q5 DNA Polimerase (NEB), o que garantiu sucesso nas amplificações.

Tabela 4. Sequência dos *primers* (*forward* e *reverse*) utilizados na amplificação do gene *Bs4*.

Primer	Gene(s) de interesse	Sequência do <i>Primer</i>
PJT923	<i>Bs4</i>	5' AAGGTGTGGGGCTGTTA 3'
PJT924	<i>Bs4</i>	5' GTTCAAGATGAACAAGCTTTCTGG 3'
PJT925	<i>Bs4</i>	5' ACTTGTAAGACTCCTGCAATCTT 3'

Para as primeiras tentativas de amplificação do gene *Bs4* por PCR, utilizamos a enzima GoTaq (Promega) em reações com a seguinte composição:

- 5 µL do tampão de reação para GoTaq
- 0,5 µL de dNTP 25mM
- 1 µL do *primer forward* 5 µM
- 1 µL do *primer reverse* 5µM
- 0,125 µL da enzima GoTaq (Promega)
- 16,375 µL de H₂O *Milli-Q*

Esse material foi submetido às condições descritas na tabela 5 em um termociclador.

Tabela 5. Programa do termociclador para reação PCR utilizando a enzima GoTaq (Promega) na amplificação do gene *Bs4*. Este PCR foi submetido a trinta ciclos de amplificação.

Temperatura	Tempo
94°C	2 minutos
94°C	30 segundos
55°C	30 segundos
72°C	45 segundos
72°C	5 minutos
4°C	∞

Em tentativas subsequentes de amplificação deste gene, utilizamos a enzima Q5 DNA Polimerase (NEB) em reações com a seguinte composição:

- 5 μ L do tampão de reação para Q5 DNA Polimerase buffer 5X
- 0,2 μ L de dNTP 25mM
- 2,5 μ L do *primer forward* 5 μ M
- 2,5 μ L do *primer reverse* 5 μ M
- 0,25 μ L da enzima Q5 DNA Polimerase (NEB)
- 13,55 μ L de H₂O *Milli-Q*

Esse material foi submetido às condições descritas na tabela 2 em um termociclador.

As reações foram realizadas em tubos de 0,2 mL contendo 24 μ L deste *mix*. Nesses tubos, adicionamos 1 μ L do DNA genômico extraído dos tomateiros mutantes ou selvagens a serem genotipados. Em um dos tubos, foi adicionado 1 μ L de DNA plasmidial de *E. coli* que carregava a construção pENTR-*Bs4*, o qual já havia sido amplificado anteriormente, servindo como um controle positivo, e em outro tubo foi adicionado 1 μ L de H₂O *Milli-Q* como controle negativo para as amplificações.

3.9 Inoculação de mutantes de *Xcc306* em tomateiro mutante *bs4*

Além dos mutantes de tomateiro, nosso laboratório acessou mutantes de *Xcc306* que são de grande relevância para este trabalho. Especificamente, o mutante quádruplo *ΔpthA1/2/3/4* de *Xcc306* foi gentilmente cedido pelo Dr. Jeff Jones (*University of Florida*). Assim, fizemos uso dos mutantes do tomateiro e de *Xcc306* para avaliar se a resposta imune desencadeada por *Xcc306* em tomateiro requer o reconhecimento de efetores PthA pelo receptor Bs4.

Cada uma das bactérias foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultura NYGA (250 mL: 1,25 g de peptona, 0,75 g de extrato de levedura, 5 mL de glicerol e 3,75 g de ágar) e 100 μ g/mL de ampicilina. Após 48h crescendo a 28°C, as células foram ressuspensas em cloreto de magnésio (MgCl₂) 10 mM e diluídas para uma O.D.₆₀₀ de 0,4. Feito isso, utilizamos uma seringa sem agulha para inserir a solução na face abaxial das folhas de tomateiro (*S. lycopersicum*) exercendo uma leve pressão com os dedos (utilizando luvas de látex) na parte adaxial.

3.10 Medição de extravasamento de eletrólitos com tomateiro

Inicialmente, nós tentamos reproduzir o experimento seguindo o mesmo protocolo utilizado em nosso laboratório com plantas de *Nicotiana benthamiana*. Para isso, recortamos

quatro pedaços de folha e as colocamos em um tubo com 6 mL de H₂O *Milli-Q*, procurando retirar tecido das áreas infiltradas para medir o extravasamento de eletrólitos e evitando pegar as partes feridas com a seringa. No entanto, o tecido dos folíolos de tomateiros é muito sensível e sofria muito com o estresse da etapa de infiltração e recorte dos discos. Como consequência, os resultados eram influenciados por outros fatores além da presença da bactéria infiltrada e foram pouco conclusivos. Pensando em otimizar esse processo, realizamos a medição de eletrólitos inserindo o folíolo inteiro em um tubo falcon de 50 mL submerso em H₂O *Milli-Q*. Para esse experimento, utilizamos tomateiros selvagens (cultivar Money Maker) e tomateiros mutantes *bs4*. Ambos foram infiltrados com *Xcc306* (*Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306) selvagem, com o mutante *ΔPthA* que apresenta deleções dos quatro efetores TAL de nosso interesse (*ΔPthA1*, *ΔPthA3*, *ΔPthA3* e *ΔPthA4*) e com o mutante *ΔhrpB2*. Uma solução de MgCl₂ 10 mM (veículo da bactéria) foi utilizada como controle negativo.

Cada uma das bactérias foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido (250 mL: 2,5 g de peptona, 1,25 g de extrato de levedura, 1,25 g de cloreto de sódio e 3,75 g de 1,5% ágar) e 100 µg/mL de ampicilina (*Xcc306* e o mutante *ΔhrpB2*) ou 100 µg/mL rifampicina (mutante *ΔPthA*). Após 48h crescendo a 28°C, as células foram ressuspensas em cloreto de magnésio (MgCl₂) 10 mM e diluídas para uma O.D.₆₀₀ de 0,4. Feito isso, utilizamos uma seringa sem agulha para inserir a solução na face abaxial das folhas dos tomateiros, exercendo uma leve pressão com os dedos (utilizando luvas de látex) na parte adaxial. A fim de reduzir interferências relativas à idade da folha, foram infiltrados quatro folíolos da mesma folha com os diferentes tratamentos.

Vinte e quatro horas após a infiltração, os folíolos foram coletados e transferidos para tubos de 50 mL contendo 40 mL de H₂O *Milli-Q*. As medições de condutividade foram realizadas com o medidor de condutividade elétrica de bancada Seven Compact Duo (Mettler Toledo) ao longo do tempo: 26, 46, 72, 92 e 97 horas pós-infiltração (hpi).

3.11 Conjugação Triparental

Experimentos conduzidos em nosso laboratório pelo estudante de iniciação científica Caio Mendes revelaram a capacidade do tomateiro em reconhecer o efetor XopAZ presente em *Xcc306*. Adicionalmente, obtivemos acesso a um mutante da bactéria *Xcc306*, o qual apresenta uma deleção nos genes que codificam os efetores XopAZ e XopQ (*Xcc306 ΔXopAZ/ΔXopQ*). Dessa forma, procedemos com a complementação dessa bactéria por meio de conjugação triparental, resultando nas cepas *Xcc306 ΔXopAZ/ΔXopQ + XopAZ*, *Xcc306 ΔXopAZ/ΔXopQ +*

XopQ e *Xcc306 ΔXopAZ/ΔXopQ* + Vetor Vazio (E.V.; *empty vector*). Destacamos que utilizamos o gene tanto o XopAZ de *Xcc306* e de *Xanthomonas cynarae* para testar se haveria alguma variação nos fenótipos observados nos resultados.

Para realizar essa complementação, cultivamos o mutante *Xcc306 ΔXopAZ/ΔXopQ*, a bactéria *E. coli* portadora da construção pJC531-XopAZ, a *E. coli* com a construção pJC531-XopQ, a *E. coli* contendo a construção pJC531-E.V. e a *E. coli* portadora do plasmídeo pRK2023, utilizado como vetor auxiliar nesse processo. Este último plasmídeo é essencial, uma vez que contém genes que codificam proteínas de mobilização fundamentais para a eficácia do processo de conjugação triparental. Essas proteínas facilitam a formação de pili conjugativos, permitindo a transferência eficiente de material genético entre células bacterianas de diferentes estirpes (FIGURSKI et al., 1979).

Utilizamos placas de Petri contendo meio LB com 30 µg/mL do antibiótico Canamicina para crescer as bactérias *E. coli* e placas de Petri contendo LB com 50 µg/mL do antibiótico Rifampicina e 100 µg/mL do antibiótico Ampicilina para crescer *Xcc306 ΔXopAZ/ΔXopQ*.

Depois de deixar as bactérias crescendo em meio líquido por 16 horas, aproximadamente, centrifugamos 2 mL de cada cultura a 5000 rpm por 3 minutos, descartamos o sobrenadante e ressuspensos o pellet em 2 mL de água ultrapura. Realizamos uma segunda centrifugação das células (5000 rpm por 3 minutos), descartamos o sobrenadante e ressuspensos o pellet em 1 mL de água ultrapura. Em seguida, misturamos 25 µL da bactéria receptora (*Xanthomonas*), 5 µL da bactéria contendo o plasmídeo pRK2023 e 5 µL da bactéria doadora. Adicionamos os 35 µL da mistura bacteriana em uma placa de Petri contendo meio LB não-seletivo, formando um "spot". Incubamos a placa por, aproximadamente, 16 horas. Ressuspensos o "spot" em 1 mL de meio LB e plaqueamos 100 µL em uma placa de Petri com meio LB contendo os antibióticos necessários para a seleção da cepa receptora que contém o plasmídeo de interesse (30 µg/mL do antibiótico Canamicina, 50 µg/mL do antibiótico Rifampicina e 100 µg/mL do antibiótico Ampicilina). Incubamos as placas por 2 dias, permitindo o crescimento e seleção das cepas desejadas. Por fim, isolamos e genotipamos as colônias, selecionando aproximadamente 7 colônias por genótipo para análise subsequente. Estas etapas são fundamentais para assegurar a eficácia do processo de conjugação triparental e garantir o sucesso na transferência controlada de material genético entre as cepas bacterianas envolvidas no experimento.

4.12 Transformação de *Agrobacterium* com os genes PthAs

Realizamos a transformação de *Agrobacterium tumefaciens* da cepa GV3101 com os plasmídeos pGWB614-PthA1, pGWB614-PthA2, pGWB614-PthA3, pGWB614-PthA4. Para isso, inserimos em uma cubeta de eletroporação 40 μ L de células eletrocompetentes e 1 μ L do vetor pGWB614 carregando o gene de interesse. Após a descarga elétrica, foram adicionados 1000 μ L de meio líquido LB na cubeta e todo material foi transferido para tubos de 1,5 mL, os quais foram incubados a 28°C por 1 hora. Ao final desse período, 100 μ L desse conteúdo foi plaqueado em placas de Petri contendo meio de cultura LB sólido e antibiótico Gentamicina, Rifampicina e Espectinomicina à concentração de 50 μ g/ μ L 100 μ g/ μ L e 100 μ g/ μ L, respectivamente.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação dos genes PthAs

Neste trabalho, avaliamos se o reconhecimento de *Xcc306* depende, exclusivamente, do receptor imune Bs4 do tomateiro. No entanto, pretendemos, futuramente, testar se os efetores PthAs são os responsáveis por desencadear esse reconhecimento, tornando a *Xcc306* avirulenta. Para amplificar as regiões codantes dos genes *PthAs*, realizamos reações de PCR utilizando os vetores pBI121-*PthAs* como moldes. Devido ao alto grau de similaridade em suas sequências de nucleotídeos, utilizamos os mesmos *primers* (*forward* e *reverse*) em todas as reações. Para isso, utilizamos a enzima Q5 polimerase (NEB) nas reações PCR e o resultado da amplificação foi avaliado em gel de agarose 1%. Obtivemos sucesso na amplificação de 3 dos 4 efetores (*PthA2*, *PthA3* e *PthA4*), os quais foram clonados no vetor pDONR207 por *Gateway*. Porém, o gene *PthA1* não pôde ser amplificado a partir dos clones pBI121 (figura 7).

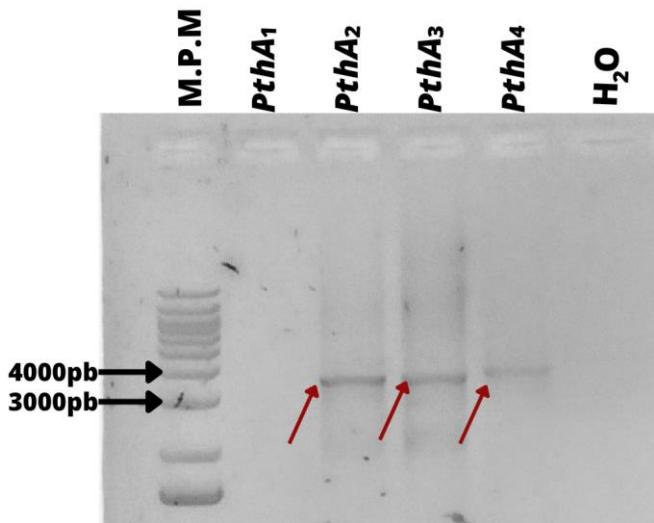


Figura 7. Gel de eletroforese de uma reação de PCR com a enzima Q5 Polimerase. Observando da esquerda para a direita está o marcador de peso molecular (M.P.M.; DNA ladder 1kb Plus, ThermoFisher), seguido dos efetores *PthA1*, *PthA2*, *PthA3*, *PthA4*, e do controle negativo contendo H₂O Milli-Q como *template* da reação. Como podemos notar, o gene *PthA1* (tamanho esperado de 3381 bp) não foi amplificado nessa reação. As setas vermelhas indicam as bandas correspondentes ao fragmento esperado em cada amplificação (*PthA2*: 3291 pb, *PthA3*: 3291 pb e *PthA4*: 3492 pb).

Uma vez que o gene *PthA1* não pôde ser amplificado a partir do clone pBI121 após múltiplas tentativas (dados não apresentados), optamos por realizar a amplificação deste gene diretamente a partir do DNA genômico da bactéria. Como já mencionado, os *primers* utilizados nestas clonagens permitem a amplificação dos quatro genes *PthA* de *Xcc306* (Tabela 1), o que constitui um desafio para o isolamento de apenas um dos genes de interesse. Por isso, fizemos uso de uma linhagem mutante de *Xcc306* que teve os quatro genes *PthA* deletados e, posteriormente, foi complementada com o gene *PthA1* (*Xcc306ΔPthA+PthA1*). Como controle, utilizamos o mutante não complementado (*Xcc306ΔPthA*). Estas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jeff Jones (*University of Florida*). Após a realização da eletroforese, uma banda consistente com o tamanho esperado (3381 pb) foi obtida apenas quando o DNA genômico de *Xcc306ΔPthA+PthA1* foi utilizado como *template* da reação (Figura 8). Essa banda foi purificada e então clonada no vetor *Gateway* pDONR207.

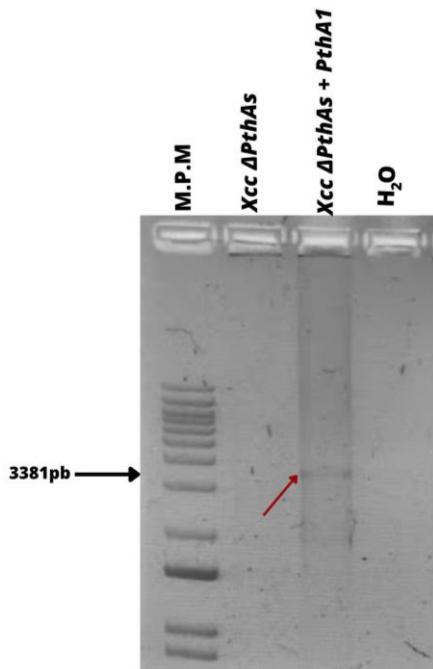


Figura 8. Gel de eletroforese de uma reação de PCR com a enzima Q5 Polimerase para amplificação do gene *PthA1*. Observando da esquerda para a direita está o marcador de peso molecular (M.P.M.; DNA ladder 1kb Plus, Thermo Fisher), ao lado do mutante que teve os 4 genes *PthAs* deletados (confirmando que nenhum deles está presente). Na sequência está o mutante complementado com o gene *PthA1* e o controle negativo contendo H_2O *Milli-Q* como *template* da reação. Como podemos notar, o gene *PthA1* (tamanho esperado de 3381 pb) foi amplificado nessa reação. A seta vermelha indica a banda correspondente ao fragmento esperado na amplificação (3381 bp).

4.2 Sequenciamento dos genes *PthAs*

Após transformar as células de *E. coli* da cepa Top 10 com o vetor de expressão pGWB614 carregando os genes *PthAs* (produto da reação LR), realizamos a extração de DNA plasmidial de algumas das colônias que cresceram na placa de Petri. Na sequência, foi feita a quantificação do DNA presente nas amostras e o ajuste da concentração das mesmas para serem enviadas para o sequenciamento Sanger.

Os *reads* obtidos nos sequenciamentos foram alinhados às sequências de referência, revelando que três dos quatro genes (*PthA1*, *PthA2* e *PthA3*) foram quase totalmente sequenciados e apresentavam a sequência esperada (figura 9). Os fragmentos sequenciados foram montados em *contigs* pelo aplicativo *SnapGene*, os quais podem ser observados como setas preenchidas pelas cores vermelho e branco nas imagens (figura 9). Os segmentos vermelhos indicam que houve correspondência com a sequência de bases esperada, enquanto os segmentos brancos indicam regiões que apresentaram sequências diferentes do esperado.

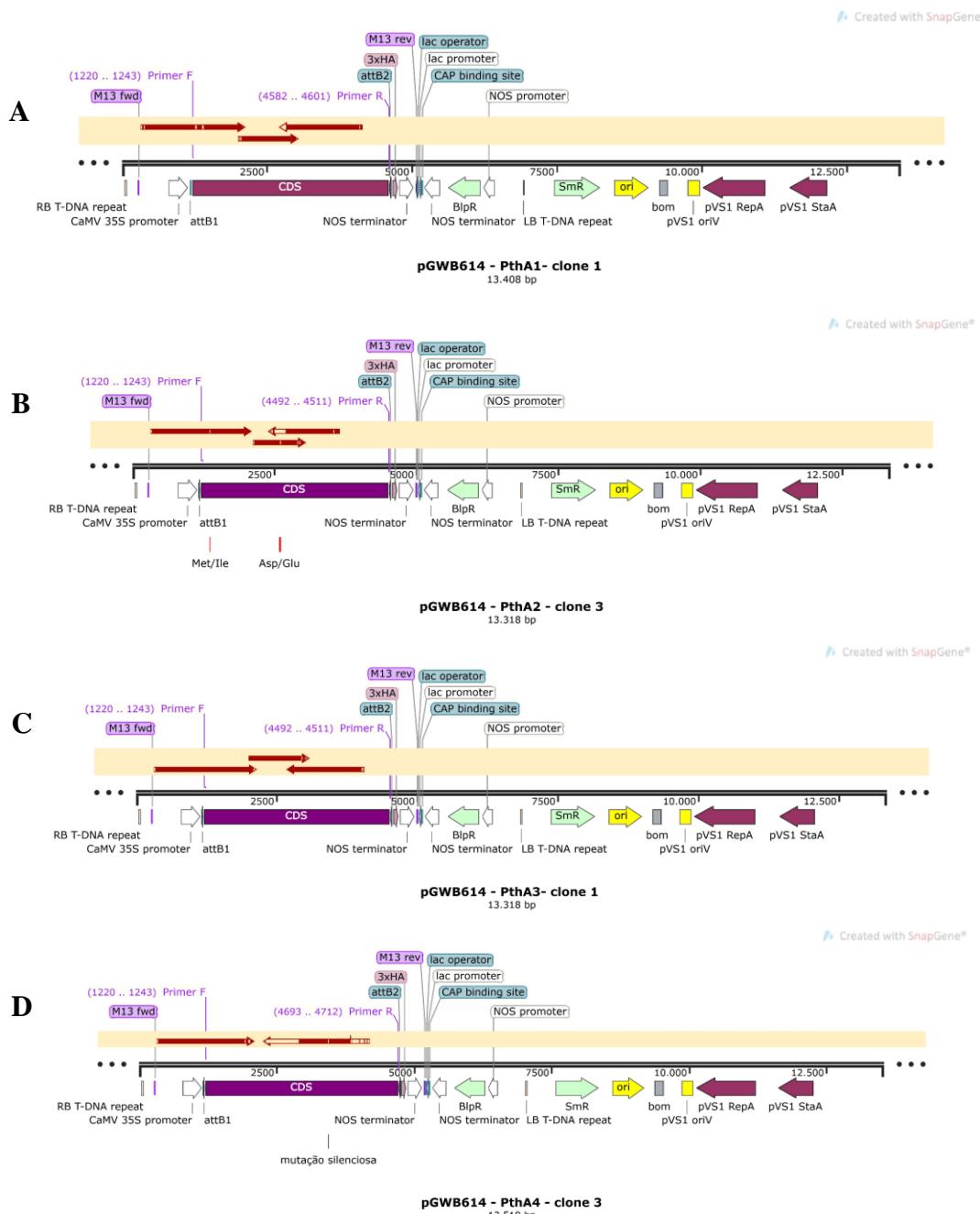


Figura 9. Resultado do sequenciamento Sanger para os genes *PthAs* clonados no vetor pGWB614. A região CDS (*Coding Sequence*) é indicada pela cor roxa. As setas vermelhas acima da CDS indicam a região que foi coberta pelo sequenciamento e coincidiu com a sequência esperada. As regiões brancas no interior dessas setas indicam que há diferença na sequência de bases que era esperada. (A) Esquema representando a CDS correspondente ao gene *PthA1*. Os três *contigs* formados cobriram a maior parte do gene de forma satisfatória restando apenas a região final por conta do *primer* que apresentou falha no desempenho. (B) Esquema representando a CDS correspondente ao gene *PthA2*. Os três *contigs* formados cobriram a maior parte do gene de forma satisfatória restando apenas a região final por conta do *primer* que apresentou falha no desempenho. Nesse caso houve duas mutações que implicaram na troca de aminoácidos, as quais estão indicadas na figura (Met/Ile e Asp/Glu). (C) Esquema representando a CDS correspondente ao gene *PthA3*. Os três *contigs* formados cobriram a maior parte do gene de forma satisfatória restando apenas a região final por conta do *primer* que apresentou falha no desempenho. (D) Esquema representando a CDS correspondente ao gene *PthA4*. Os dois *contigs* formados cobriram parte do gene, mas ainda se observa a presença de uma região considerável que não coincidiu com a sequência esperada.

Por se tratar de genes grandes, com aproximadamente 4000 pb contendo sequências altamente repetitivas e ricas em conteúdo GC, o sequenciamento Sanger que depende do anelamento de *primers* internos e sequenciamento de fragmentos se torna muito trabalhoso (e requer muitos *reads*). Por conta disso, decidimos realizar o sequenciamento dos nossos plasmídeos com a tecnologia *Oxford Nanopore*, a qual gera *reads* extremamente longos e apresenta como resultado o plasmídeo sequenciado como um todo, sem depender de *primers* internos. Este sequenciamento foi realizado pela empresa *Plasmidsaurus* (EUA).

Embora incompleto, o sequenciamento Sanger evidenciou pequenas variações na sequência de nucleotídeos esperada para alguns dos genes clonados no vetor pDONR207. Uma vez que obtivemos acesso a outros clones de entrada dos genes PthA por intermédio do Prof. Jeff Jones durante a execução do projeto (plasmídeo pENTR), decidimos conduzir o sequenciamento e a confirmação destes novos clones. Além dos genes PthA de *Xcc306*, também realizamos o sequenciamento do gene que codifica o receptor Bs4 do tomateiro, o qual também estava clonado no plasmídeo pENTR. Os resultados obtidos a partir da análise de sequenciamento Nanopore indicam que os plasmídeos pENTR, de fato, portam a sequência correta dos genes PthAs. Contudo, o sequenciamento do plasmídeo pENTR-Bs4 revelou a presença de apenas um fragmento do gene *Bs4*, seguido por um segmento de DNA de *Escherichia coli* (*E. coli*), o qual codifica uma transposase. Dada a recorrência dessa observação em diferentes clones sequenciados, conjecturamos que a sequência enviada para nosso laboratório em pENTR já apresenta essa falha.

4.3 Genotipagem dos tomateiros

Para genotipagem dos tomateiros selvagens e mutantes, foram utilizados *primers* internos que amplificam a região que apresenta uma deleção de 569 pb no mutante, responsável por tornar o gene *Bs4* não funcional. Os *primers* utilizados flanqueiam esta deleção e, como consequência, o amplicon tem tamanho esperado de 1892 bp e 1323 bp em plantas selvagens e mutantes homozigotas, respectivamente. Nas primeiras tentativas de genotipar esses tomateiros, utilizamos a enzima GoTaq, no entanto, nenhum fragmento foi amplificado. Testamos *primers* que já haviam funcionado anteriormente para amplificar outra região do gene, mas ainda não havia bandas ao corrermos o gel, indicando que o problema não estava nos *primers*. Também utilizamos DNA plasmidial de *E. coli* contendo a construção pENTR-Bs4 que já havia sido amplificado anteriormente, como controle positivo. Esta reação também não resultou em bandas, indicando que o problema também não estava no DNA que serviu como

substrato para a reação. Finalmente, testamos utilizar a enzima Q5 polimerase (NEB), o que nos permitiu amplificar a região de interesse.

O primeiro par de *primer* testado foi PJT923 e PJT925, os quais amplificam uma região de 1892pb no tomateiro selvagem. Testamos também um par de *primer* que amplifica um fragmento menor, de 833pb (figura 10), mas que ainda compreende a região da mutação analisada. Neste caso, o tamanho esperado do amplicon no mutante é de 264pb. Dessa forma, pudemos confirmar que ambos os pares de *primer* estão funcionando adequadamente para genotipagem dos tomateiros.

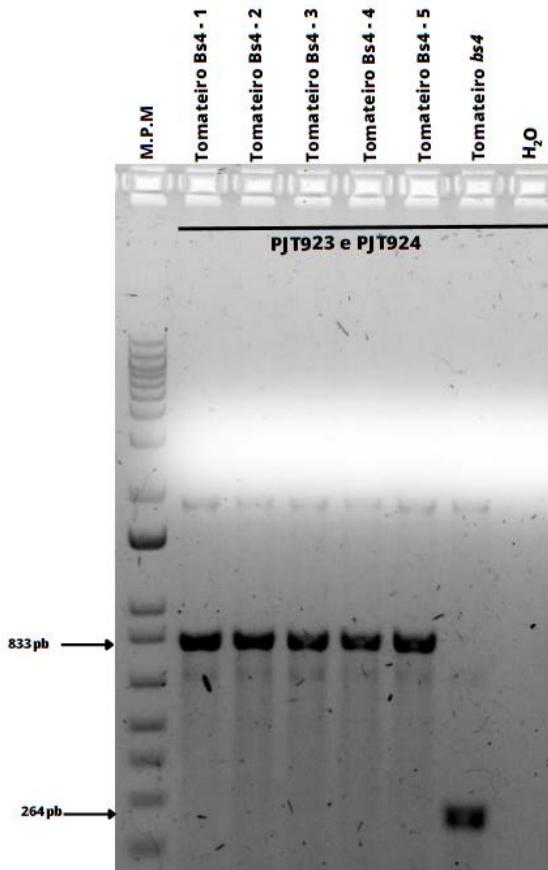


Figura 10. Gel de eletroforese de uma reação de PCR com a enzima Q5 Polimerase (NEB) para amplificação do gene *Bs4*. Observando da esquerda para a direita está o marcador de peso molecular (MPM; DNA ladder 1kb Plus, Thermo Fisher), ao lado de cinco tomateiros cultivar Money Maker selvagem distintos, os quais contêm o gene *Bs4* completo. Na sequência está o tomateiro mutante *bs4* gerado por CRISPR/Cas9, que apresenta uma deleção de 569 pb no gene. Por fim, o controle negativo contendo H₂O Milli-Q como template da reação. Como podemos notar, o gene *Bs4* (tamanho esperado de 833 bp) foi amplificado nessa reação a partir do DNA extraído de tomateiros selvagens. Há uma seta preta indicando a banda correspondente ao fragmento esperado da amplificação (833 bp). Já para o tomateiro mutante, observamos que uma banda de 264 pb foi amplificada, indicando que existe de fato uma deleção de 569 pb que torna esse gene não funcional. Há uma seta preta indicando a banda correspondente ao fragmento esperado da amplificação (264 pb). Não há presença de banda no controle negativo. Os *primers* utilizados foram PJT923 e PJT924.

4.4 Inoculação de tomateiro mutante *bs4* com mutantes $\Delta PthA$ de *Xcc306*

Em nosso laboratório, adquirimos mutantes tanto de tomateiro quanto de *Xcc306* de grande relevância para este trabalho. Através de uma colaboração com o Professor Thomas Lahaye, da Universidade de Tübingen (Alemanha), conseguimos acesso a plantas de tomateiro mutantes para o gene *Bs4*, as quais foram criadas utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9. Além disso, recebemos gentilmente do Dr. Jeff Jones, da Universidade da Flórida, o mutante quádruplo $\Delta pthA1/2/3/4$ de *Xcc306*. Portanto, utilizamos esses mutantes para investigar se a resposta imune desencadeada pelo *Xcc306* em plantas de tomateiro depende do reconhecimento dos efetores PthA pelo receptor Bs4. Em um primeiro experimento, plantas selvagens do cultivar Money Maker e seu mutante *bs4* foram inoculadas com *Xcc306* selvagem, $\Delta hrpB2$ (incapaz de injetar efetores na célula vegetal) e $\Delta pthA1/2/3/4$ (não produz efetores TAL). Como esperado, plantas selvagens apresentaram HR quando inoculadas com *Xcc306*, mas não com o mutante $\Delta hrpB2$ (figura 11). Notavelmente, o mutante $\Delta pthA1/2/3/4$ também foi capaz de induzir HR em plantas selvagens, indicando que a bactéria ainda é reconhecida pelo tomateiro mesmo na ausência de efetores PthA. Esta conclusão é reforçada pelo mutante *bs4*, uma vez que estas plantas ainda reconhecem *Xcc306* (figura 11). Portanto, o reconhecimento do patógeno pelo tomateiro pode ocorrer na ausência de Bs4, sugerindo a existência de outros receptores que reconhecem *Xcc306* nesta planta.

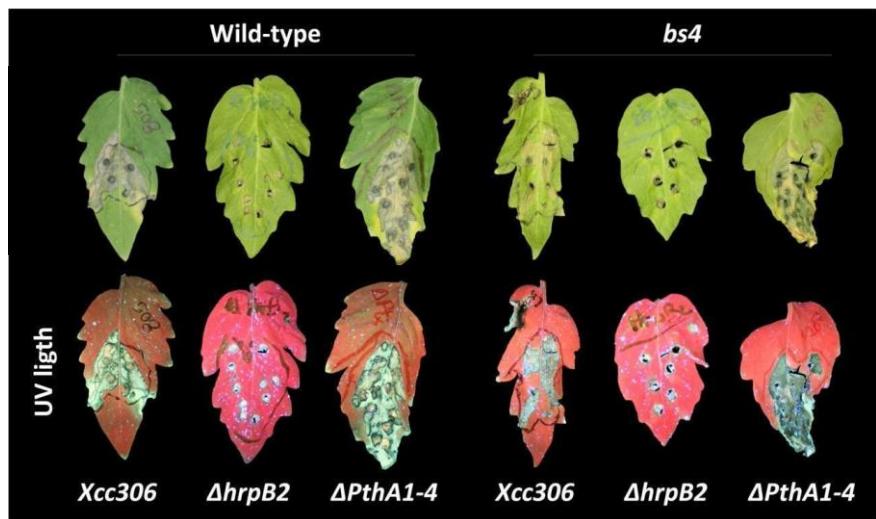


Figura 11. O reconhecimento de *Xcc306* por tomateiro independe de efetores PthA e do receptor Bs4. Plantas selvagens (cultivar *Money Maker*) e seu mutante *bs4* foram inoculadas com *Xcc306*, $\Delta hrpB2$ e $\Delta pthA1/2/3/4$ a uma OD de 0.8. Após uma semana, as folhas foram visualizadas sob luz branca e ultravioleta. Regiões apresentando HR (morte celular) refletem a cor verde sob luz ultravioleta. As lesões nas folhas inoculadas com $\Delta hrpB2$ foram causadas pela seringa utilizada para a infiltração da bactéria.

4.5 Outros efetores de *Xanthomonas* são potencialmente reconhecidos pelo tomateiro

Experimentos realizados pelo aluno de iniciação científica do nosso laboratório, Caio Vinícius Cardoso Mendes (processo FAPESP 2020/04773-8), mostraram que o efetor XopAZ de *Xanthomonas* é potencialmente reconhecido pelo tomateiro. Neste experimento, 22 dos 29 efetores de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 foram clonados no vetor binário pGWB614 e transferidos para *A. tumefaciens* GV3101. Até o momento, 21 destes já foram expressos transientemente em folíolos de tomateiros via agroinfiltração, exceto o efetor AvrBs2. Os folíolos foram fotografados sob luz ultravioleta seis dias após a infiltração com *Agrobacterium* (Figura 12).

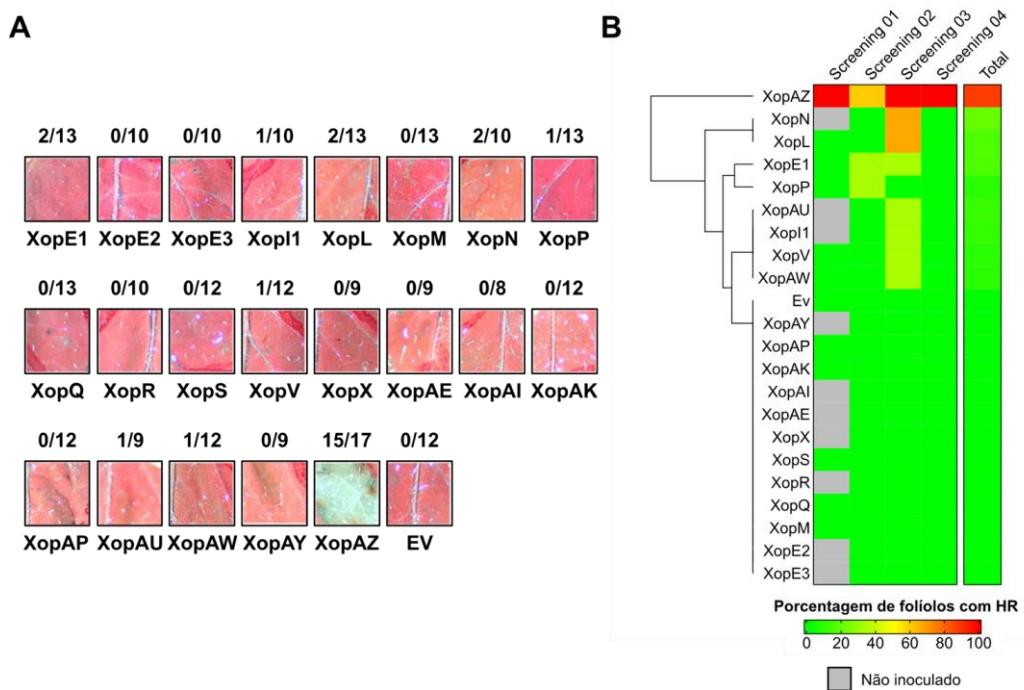


Figura 12. Screening de efetores de *Xcc306* em folíolos de tomateiro. (A) Recortes das fotografias de folíolos de tomateiro Fla8000 com enfoque na área inoculada com *A. tumefaciens* carregando efetores de *Xcc306* clonados no vetor de expressão pGWB614 (O.D.600nm = 0,8) em conjunto com *A. tumefaciens* carregando P19 (O.D.600nm = 0,2). As fotografias foram tiradas 6dpi sob luz UV Dessa forma, tecidos vivos apresentam a cor vermelha e tecidos mortos apresentam cor esverdeada, facilitando sua identificação. O vetor pGWB614 vazio (EV) foi utilizado como controle negativo. Acima de cada quadro é possível observar algarismos representando o número de réplicas biológicas com fenótipo de morte celular pelo número total de réplicas avaliadas. É possível observar que o efetor XopAZ induziu morte celular em 15 das 17 réplicas do experimento. (B) Heatmap indicando a porcentagem de folíolos com HR em cada um dos 4 experimentos realizados, sendo que a cor vermelha representa valores próximos a 100% e a cor verde valores próximos a 0%. Novamente, é claramente visível que a superexpressão de XopAZ induz a morte celular de forma consistente. Nossos experimentos com os genes *PthAs* irão complementar este screening.

Foi possível observar morte celular apenas nos folíolos inoculados com XopAZ, enquanto as demais infiltrações não induziram resposta imune de forma consistente. Isso indica que, além dos PthAs, existe de fato a possibilidade de outros efetores estarem sendo reconhecidos pelo tomateiro e levando a uma resposta imune resultante em morte celular visível. Isto corrobora os experimentos realizados com mutantes quadrúplos de *Xanthomonas* e o tomateiro mutante *bs4* nos quais ainda havia HR mesmo na ausência dos PthAs e do receptor Bs4 simultaneamente (Figura 11), indicando que outros efetores estariam sendo reconhecidos.

4.6 Quantificação do vazamento de eletrólitos durante HR em tomateiro

Para quantificar os resultados observados, realizamos experimentos de extravasamento iônico com as folhas de tomateiro inoculadas. Conforme ocorre o processo de morte celular, os eletrólitos contidos no meio intracelular são extravasados para o meio extracelular (nesse caso, H₂O *Milli-Q*). Por conta disso, é possível avaliar a progressão da morte do tecido foliar em diferentes momentos através da medição da condutância da H₂O *Milli-Q* na qual os discos estão imersos. Quanto maior a condutância, mais íons na água e, consequentemente, mais avançado o grau de morte celular dos pedaços de folhas ali presentes.

Em uma primeira tentativa, utilizamos quatro pedaços de folha imersos em 6 mL de H₂O *Milli-Q*. No entanto, os resultados foram pouco conclusivos devido ao estresse que o tecido foliar sofreu nas etapas de infiltração, recorte e medição (figura 13), sendo que mesmo alguns folíolos infiltrados com MgCl₂ mostraram valores elevados por conta de ferimentos ao longo do processo. Assim, não houve diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos.

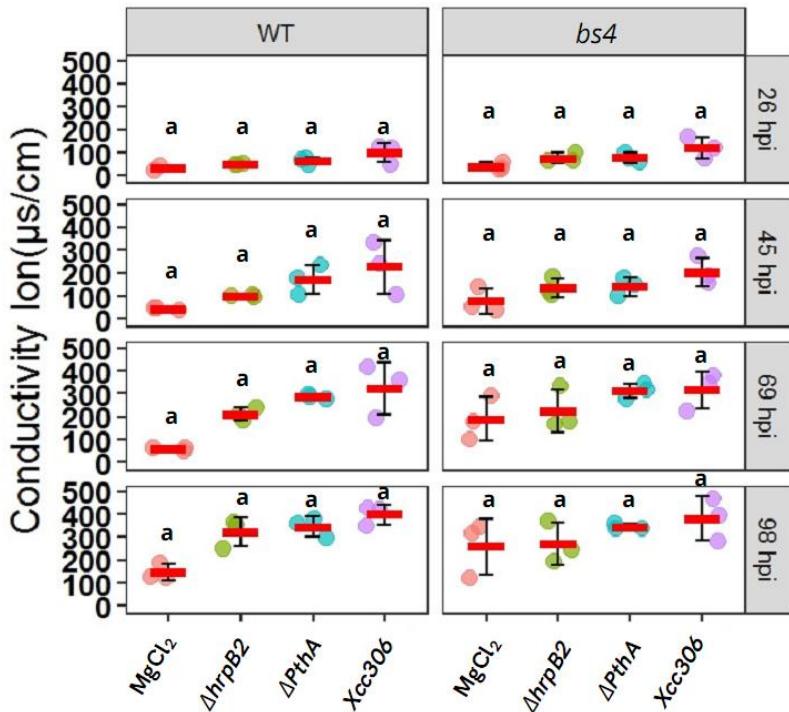


Figura 13. Detecção da resposta imune do tipo ETI através da medição de extravasamento iônico em tomateiro utilizando pedaços dos folíolos. Resultados referentes às medições de vazamento de íons registradas durante o experimento. A ocorrência de morte celular leva à liberação de íons do tecido para o meio e, consequentemente, ocorre o aumento da condutividade da água no qual ele se encontra. Folhas de tomateiro (Money Maker e *bs4*) foram infiltradas com *Xcc306*, com o mutante *ΔPthA₍₁₋₄₎*, com o mutante *ΔhrpB2* e *MgCl₂*, (controle negativo). Foram retirados 4 pedaços de folíolos com cada tratamento, os quais foram colocados em tubos contendo 6 mL de *H₂O Milli-Q*. A condutividade elétrica foi medida ao longo do tempo utilizando um medidor de condutividade de bancada (Metter Toledo). As medições foram realizadas 26 hpi, 45 hpi, 69 hpi e 98 hpi. No lado esquerdo do gráfico estão os resultados obtidos a partir da infiltração em tomateiro Money Maker selvagem (WT) e à direita estão os resultados obtidos a partir da infiltração em tomateiro mutante *bs4*. Notavelmente, os valores obtidos dos folíolos infiltrados com o vetor *Xcc306* e o mutante *ΔPthA* de ambas as plantas foram superiores, corroborando o fato de que existem outras proteínas efetoras e outros receptores do tomateiro envolvidos no processo de reconhecimento. No entanto, os folíolos infiltrados com o mutante *ΔhrpB2* também apresentaram valores elevados, o que não era esperado, com base nos experimentos anteriores. Os folíolos do mutante *bs4* também apresentaram valores elevados de extravasamento iônico ao serem infiltrados com *MgCl₂*, mostrando que os resultados não foram muito conclusivos e apresentavam vários ruídos provenientes de diversos fatores de estresse. As médias dos valores obtidos de três folíolos diferentes por condição estão representadas pelo traço vermelho e os valores individuais de cada réplica estão representados pelos pontos rosados (*MgCl₂*), verdes (*ΔhrpB2*), ciano (*ΔPthA*) e lilás (*Xcc306*). As diferenças estatísticas estão representadas por letras de “a” a “d”, as quais foram calculadas com base na análise de Variância (ANOVA) e no teste de significância honesta de Tukey ou teste HSD (*Honest Significant Difference*) de Tukey.

Ao analisar os resultados do experimento utilizando o folíolo inteiro no tubo Falcon (figura 15), pudemos perceber que, como esperado com base nos experimentos anteriores, plantas selvagens e mutantes infiltradas com *Xcc306* e com o mutante *ΔPthA* apresentaram forte morte celular, a qual não ocorreu quando foi infiltrado o MgCl₂ (Figura 14).

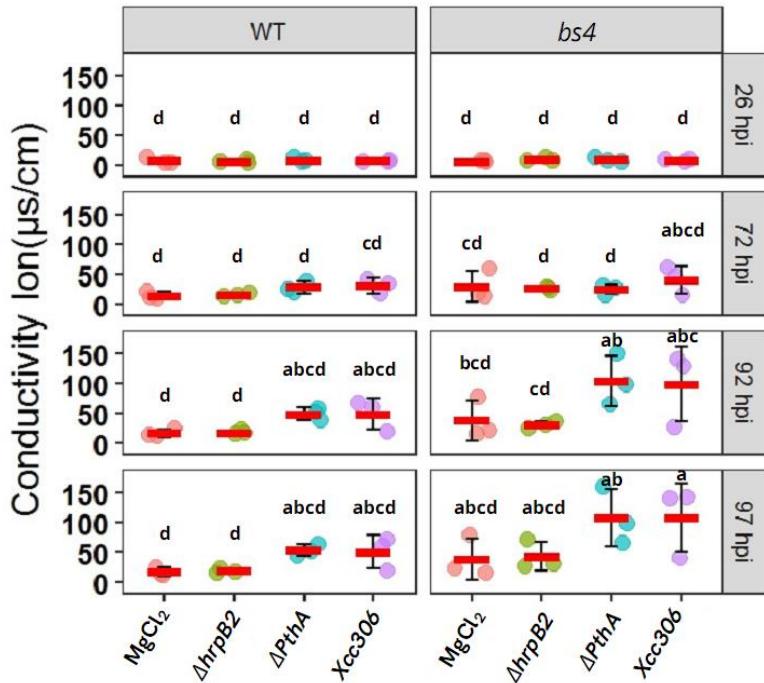


Figura 14. Detecção da resposta imune do tipo ETI através da medição de extravasamento iônico em tomateiro utilizando os folíolos inteiros. Resultados referentes às medições de vazamento de íons registradas durante o experimento. A ocorrência de morte celular leva à liberação de íons do tecido para o meio e, consequentemente, ocorre o aumento da condutividade da água no qual ele se encontra. Folhas de *tomateiro* (*Money Maker* e *bs4* CRISPR/Cas9) foram infiltradas com *Xcc306*, com o mutante *ΔPthA*, com o mutante *ΔhrpB2* e MgCl₂ (controle negativo). Foram retirados 3 folíolos com cada tratamento, os quais foram colocados em tubos contendo 40 mL de H₂O *Milli-Q*. A condutividade elétrica foi medida ao longo do tempo utilizando um medidor de condutividade de bancada (Metter Toledo). As medições foram realizadas 26 hpi, 46hpi., 72hpi., 92hpi. e 97hpi. Do lado esquerdo do gráfico estão os resultados obtidos a partir da infiltração em tomateiro *Money Maker* e na parte direita estão os resultados obtidos a partir da infiltração em tomateiro *bs4* obtido por CRISPR/Cas9. Notavelmente, os valores obtidos dos folíolos infiltrados com *Xcc306* e o mutante *ΔPthA* de ambas as plantas foram superiores, corroborando o fato de que existem outras proteínas efetoras e outros receptores do tomateiro envolvidos no processo de reconhecimento. As médias dos valores obtidos de três folíolos diferentes por condição estão representadas pelo traço vermelho e os valores individuais de cada réplica estão representados pelos pontos rosados (MgCl₂), verdes (*ΔhrpB2*), ciano (*ΔPthA*) e lilás (*Xcc306*). As diferenças estatísticas estão representadas por letras de “a” a “d”, as quais foram calculadas com base na análise de Variância (ANOVA) e no teste de significância honesta de Tukey ou teste HSD (*Honest Significant Difference*) de Tukey.



Figura 15. Experimento de medição de extravasamento de eletrólitos com tomateiros. Folíolos de tomateiro imersos em 40 mL de H₂O *Milli-Q* no interior de tubos de 50 mL nos quais as medições foram realizadas utilizando o medidor de condutividade elétrica de bancada Seven Compact Duo (Mettler Toledo).

Este resultado confirmou os resultados dos experimentos anteriormente realizados, demonstrando que mesmo na ausência dos quatro efetores PthAs e do receptor Bs4, simultaneamente, ainda ocorre o reconhecimento da bactéria pelo tomateiro. Ou seja, existem outros efetores da bactéria e receptores do tomateiro envolvidos nesse processo.

Neste experimento, preparamos dois grupos de folíolos para cada condição testada: o primeiro composto por três folíolos foi utilizado para medições de extravasamento iônico, e o segundo no qual dois folíolos foram mantidos na planta para a visualização da morte celular (HR) a olho nu. Quatro dias após a infiltração, as folhas do segundo grupo foram fotografadas, revelando uma acentuada morte celular nos folíolos de ambos os tomateiros infiltrados com *Xcc306* e o mutante *ΔPthA*. No decorrer do experimento, foi possível observar o aumento gradativo do extravasamento iônico ao longo do tempo apenas nas plantas infiltradas com as bactérias *Xcc306* e com o mutante *ΔPthA*. Embora ainda não se configure como uma diferença estatisticamente significativa, já observa-se nas folhas infiltradas com a bactéria selvagem e com o mutante *ΔPthA* uma tendência na qual os valores são superiores em comparação com as folhas infiltradas com controle negativo e com o mutante *ΔhrpB2*.

Este primeiro experimento mostra que o uso de folíolos inteiros pode ser uma abordagem válida para a medição de extravasamento iônico em tomateiro. No futuro, buscaremos otimizar este sistema através da redução da quantidade de H₂O *Milli-Q* no tubo, para que os eletrólitos não fiquem tão diluídos. Também iremos observar os folíolos por um período maior de tempo

(além de quatro dias após a infiltração), e buscar reduzir potenciais variações relacionadas a diferenças da área foliar infiltrada.

4.7 Expressão transiente de PthAs em tomateiros

Após a verificação da integridade das sequências dos genes *PthAs* no vetor de entrada pENTR, procedemos com a transformação da cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* com os plasmídeos pGWB614, resultantes da reação LR de clonagem *Gateway*. Posteriormente, realizaremos a expressão transitória desses genes em plantas de tomateiro, tanto selvagens quanto mutantes para o gene *bs4*, com o intuito de investigar a possibilidade de desencadeamento de uma resposta imune em decorrência do reconhecimento desses efetores. Também buscamos avaliar a essencialidade do gene *bs4* nesse processo de reconhecimento. Além disso, realizamos a coexpressão transiente de efetores PthA e Bs4 em *Nicotiana benthamiana* para observar se esses efetores são capazes de induzir a Resposta de Hipersensibilidade (HR) dependente de Bs4. Estes experimentos estão atualmente em andamento.

6 DISCUSSÃO

O sistema imune vegetal, diferente do que ocorre em mamíferos, não conta com células de defesa móveis. Portanto, cada célula é autônoma em termos de defesa e é responsável por reconhecer e combater diferentes patógenos através de uma interação específica entre moléculas do patógeno e receptores, citoplasmáticos (NLRs) ou transmembranares (PRRs) presentes na célula vegetal. Logicamente, essa interação planta-patógeno, no decorrer da história evolutiva, foi e ainda é responsável por selecionar diferentes genótipos e fenótipos, tanto nas plantas, que possibilitam a elas se defenderem de variados patógenos, quanto nos patógenos, que os permitem infectar um maior número de hospedeiros. Ou seja, essa pressão evolutiva seleciona características que se mostraram mais vantajosas nessa constante “corrida armamentista” (JONES & DANGL, 2006).

Este trabalho visou compreender o que torna o tomateiro *S. lycopersicum* resistente à bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (*Xcc306*). Até o momento, sabemos que a capacidade de *Xcc306* causar HR no hospedeiro é dependente da proteína HrpB2, a qual é necessária para o transporte de efetores da bactéria para dentro da célula vegetal através do sistema de secreção do tipo III (ROSSIER *et al.*, 2002). Esta observação suporta a hipótese de que o reconhecimento de *Xcc306* pelo tomateiro seja realizado por receptores NLRs.

Um receptor TIR-NLR presente em tomateiro é o Bs4. Este é capaz de reconhecer o efetor AvrBs4, mas também consegue reconhecer o efetor AvrBs3 quando superexpresso. O efetor AvrBs3 apresenta alto grau de similaridade com AvrBs4 (97%) (SCHORNACK *et al.*, 2005) e talvez esse seja um dos motivos que possibilite esse reconhecimento. Sabendo disso, temos em *Xcc306* quatro efetores TAL. Estes quatro efetores (denominados PthAs) possuem alta identidade entre si e diferem essencialmente no número de repetições do domínio central e por resíduos polimórficos encontrados dentro das unidades repetitivas. Ainda, a identidade na sequência de aminoácidos destes efetores com avrBs4 varia entre 88% e 96%, sendo o PthA4 o mais similar a avrBs4. Ainda assim, apenas o grau de similaridade entre os efetores PthAs e avrBs4 não nos permite anteciparmos resultados com confiança, pois os fatores moleculares que determinam o reconhecimento eficiente de efetores TAL de *Xanthomonas* por Bs4 ainda são pouco compreendidos. Portanto, a realização de experimentos é essencial.

Nossa hipótese é que esse receptor (Bs4) teria um papel fundamental no reconhecimento de pelo menos um desses efetores TAL de *Xcc306*. Isso explicaria, ao menos em partes, a resposta de hipersensibilidade que torna o tomateiro resistente a esse patógeno de citros. Ainda assim, é

possível que outros efetores de *Xcc306* sejam reconhecidos pelo tomateiro em paralelo. Esta hipótese está sendo testada pelo nosso laboratório. Utilizando mutantes de *Xcc306* que apresentam deleções dos genes que codificam esses efetores, realizamos a infecção de tomateiro selvagem e mutante *bs4*. Nossos resultados mostraram que mesmo com a deleção dos quatro efetores PthA simultaneamente ($\Delta PthA1/2/3/4$), a planta selvagem ainda é capaz de reconhecer a bactéria. Além disso, o mutante *bs4* também exibe resposta imune quando inoculada com *Xcc306*, indicando que o reconhecimento deste patógeno por tomateiro não depende exclusivamente da detecção de efetores PthA por *Bs4*. Isso, no entanto, não exclui a possibilidade de os efetores PthA serem reconhecidos por *Bs4* e constituírem fatores de avirulência nesta interação. De fato, nosso laboratório tem avaliado a hipótese de que um dos fatores que determinam a resistência duradoura de plantas não-hospedeiras seja o reconhecimento de múltiplos efetores simultaneamente por diferentes receptores NLR, o que resultaria em um circuito redundante de imunidade. Neste sentido, nosso laboratório recentemente descobriu que ao menos um efetor de *Xcc306* (XopAZ) é reconhecido pelo sistema imune do tomateiro. Assim, nossa hipótese atual é que cinco efetores de *Xcc306* (XopAZ e os quatro PthAs) são reconhecidos por esta planta. Posteriormente, com as linhagens de bactérias oriundas do procedimento de conjugação triparental, poderemos realizar experimentos a fim de observar se o XopAZ é o único efetor presente em *Xcc306* responsável por desencadear HR em tomateiro, ou se mesmo na sua ausência, a bactéria ainda é reconhecida. Caso a bactéria ainda seja capaz de desencadear uma resposta imune poderemos concluir que existem outros efetores (possivelmente os PthAs) da *Xcc306* sendo reconhecidos pelo tomateiro.

Recentemente, iniciamos experimentos para testar se os efetores PthA, quando superexpressos em folhas de tomateiro selvagem e *bs4* de forma individual, resultam em uma resposta imune (i.e., morte celular decorrente de HR). A coexpressão de efetores PthA e *Bs4* em folhas de *N. benthamiana* também será realizada e poderá nos informar se o receptor *Bs4* possui o potencial de reconhecer algum dos PthA de *Xcc306*. Além disso, pretendemos transformar bactérias da cepa *X. euvesicatoria* 85-10 (virulenta em tomateiro) com os genes *PthA1*, *PthA2*, *PthA3* e *PthA4* e observar se alguma dessas transformações tornará a bactéria avirulenta, desencadeando uma resposta imune. Como controle negativo, utilizaremos o mutante para o gene *Bs4*, o qual não deverá apresentar resposta imune caso os PthAs sejam fatores de avirulência. Assim, os resultados destes experimentos se somarão aos resultados já obtidos e nos permitirão determinar fatores que tornam o tomateiro resistente à bactéria *Xcc306*.

7 CONCLUSÃO

Experimentos de inoculação em *S. lycopersicum* indicaram que o reconhecimento de *Xcc306* depende da proteína HrpB2, componente do sistema de secreção bacteriano do tipo III. Portanto, o reconhecimento de *Xcc306* pelo tomateiro provavelmente envolve receptores citoplasmáticos (NLRs). No entanto, mesmo com a deleção dos genes codificantes dos quatro efetores TAL (*PthA1*, *PthA2*, *PthA3* e *PthA4*), o reconhecimento de *Xcc306* ainda foi observado em folhas de tomateiro. Isso sugere que outros efetores do patógeno podem ser reconhecidos pela planta, não excluindo a possibilidade de reconhecimento de PthAs por Bs4. De fato, experimentos conduzidos em nosso laboratório apoiam a hipótese de que outros efetores de *Xcc306* podem ser potencialmente reconhecidos pelo tomateiro, uma vez que a expressão do efetor XopAZ em tomateiro induziu uma resposta imune, resultando em morte celular nos folíolos.

Por fim, uma abordagem sugerida para medir a resposta de hipersensibilidade (HR) em experimentos futuros com tomateiros é imergir o folíolo inteiro em H₂O *Milli-Q* para evitar interferências de outros fatores de estresse no tecido. Este procedimento foi estabelecido e validado durante a execução deste projeto, nos permitindo quantificar a morte celular induzida por *Xcc306*.

REFERÊNCIAS

- ABE, Valeria Yukari; BENEDETTI, Celso Eduardo. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Molecular Plant Pathology**, [s.l.], v. 17, n. 8, p. 1223-1236, 15 mar. 2016. Wiley.<http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12359>
- ADACHI, Hiroaki; DEREVNINA, Lida; KAMOUN, Sophien. NLR singletons, pairs, and networks: evolution, assembly, and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. **Current Opinion In Plant Biology**, [S.L.], v. 50, p. 121-131, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2019.04.007>.
- AMARAL, Alexandre M. do; TOLEDO, Cristiane P.; BAPTISTA, Juliana C.; MACHADO, Marcos A.. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 292-294, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO).<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-41582005000300013>
- BAI, Shiwei; LIU, Jie; CHANG, Cheng; ZHANG, Ling; MAEKAWA, Takaki; WANG, Qiuyun; XIAO, Wenkai; LIU, Yule; CHAI, Jijie; TAKKEN, Frank L. W.. Structure-Function Analysis of Barley NLR Immune Receptor MLA10 Reveals Its Cell Compartment Specific Activity in Cell Death and Disease Resistance. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. e1002752, 7 jun. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002752>.
- BAYLESS, Adam M.; NISHIMURA, Marc T.. Enzymatic Functions for Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Proteins in the Plant Immune System. **Frontiers In Genetics**, [S.L.], v. 11, p. 1-16, 2 jun. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2020.00539>.
- BEHLAU, Franklin. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 1-12, 24 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-020-00377-2>.
- BIAZOLI JUNIOR, Claudinei E.; MACHADO, Fábio de A.; TRABUCO, Leonardo G.; MARQUES, Victor X.; LIMA, Ubiratan A.A **HIPÓTESE DA RAINHA VERMELHA**. Disponível em: <http://www.cecim.usp.br/~ltrabuco/escritos/redqueen.pdf>. Acesso em: 5 maio 2020.
- BONARDI, Vera; DANGL, Jeffery L.. How complex are intracellular immune receptor signaling complexes? **Frontiers In Plant Science**, [s.l.], v. 3, p. 1-9, 23 out. 2012. Frontiers Media SA.<http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2012.00237>.
- CASEY, Lachlan W.; LAVRENCIC, Peter; BENTHAM, Adam R.; CESARI, Stella; ERICSSON, Daniel J.; CROLL, Tristan; TURK, Dušan; ANDERSON, Peter A.; MARK, Alan E.; DODDS, Peter N.. The CC domain structure from the wheat stem rust resistance protein Sr33 challenges paradigms for dimerization in plant NLR proteins. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 113, n. 45, p. 12856-12861, 17 out. 2016. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1609922113>.
- DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J.. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. **Science**, [s.l.], v. 341, n. 6147, p. 746-751, 16 ago. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS).<http://dx.doi.org/10.1126/science.1236011>

DANGL, Jeffery L.; JONES, Jonathan D. G.. A pentangular plant inflammasome. **Science**, [S.L.], v. 364, n. 6435, p. 31-32, 5 abr. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aax0174>

DOMINGUES, Mariane Noronha. **Caracterização de proteínas de Citrussinensis que interagem com a proteína efetora PthA, indutora do cancro cítrico**. 2011. 147 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia, Campinas, 2011.

FIGURSKI, David H.; HELINSKI, Donald R.. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 76, n. 4, p. 1648-1652, abr. 1979. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>.

FÖRDERER, Alexander; KOURELIS, Jiorgos. NLR immune receptors: structure and function in plant disease resistance. **Biochemical Society Transactions**, [S.L.], v. 51, n. 4, p. 1473-1483, 21 ago. 2023. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bst20221087>.

GIBSON, Daniel G; YOUNG, Lei; CHUANG, Ray-yuan; VENTER, J Craig; A HUTCHISON, Clyde; SMITH, Hamilton O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, [s.l.], v. 6, n. 5, p. 343-345, 12 abr. 2009. Springer Science and Business Media LLC.<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1318>.

GOMES, Luiz Humberto; DUARTE, Keila Maria Roncato; ANDRINO, Felipe Gabriel; TAVARES, Flavio Cesar Almeida. A simple method for DNA isolation from *Xanthomonas* spp.

JIA, Aolin; HUANG, Shijia; MA, Shoucui; CHANG, Xiaoyu; HAN, Zhifu; CHAI, Jijie. TIR-catalyzed nucleotide signaling molecules in plant defense. **Current Opinion In Plant Biology**, [S.L.], v. 73, p. 102334, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102334>.

Scientia Agricola, [s.l.], v. 57, n. 3, p. 553-555, set. 2000. FapUNIFESP (SciELO).<http://dx.doi.org/10.1590/s0103-90162000000300028>.

JONES, Jonathan D. G.; DANGL, Jeffery L.. The plant immune system. **Nature**, [s.l.], v. 444, n. 7117, p. 323-329, 16 nov. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05286>.

MACHO, Alberto P.; ZIPFEL, Cyril. Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. **Molecular Cell**, [S.L.], v. 54, n. 2, p. 263-272, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.021>

MARCUZZO, Leandro Luiz. ASPECTOS EPIDEMIÓLOGICOS DE SOBREVIVÊNCIA E DE AMBIENTE NO GÊNERO *Xanthomonas*. **Ágora**, [s.i.], v. 16, p. 13-19, 2009.

MAYR, E. 1970 [1963]. Populações, Espécies e Evolução. Edusp, São Paulo, Brasil. (Cap. 2. Os conceitos de espécie e sua aplicação. p.11-21)

MONTEIRO, Freddy; NISHIMURA, Marc T.. Structural, Functional, and Genomic Diversity of Plant NLR Proteins: an evolved resource for rational engineering of plant immunity. : An Evolved Resource for Rational Engineering of Plant Immunity. **Annual Review Of Phytopathology**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 243-267, 25 ago. 2018. AnnualReviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045817>.

PARKER, Jane E.; HESSLER, Giuliana; CUI, Haitao. A new biochemistry connecting pathogen detection to induced defense in plants. **New Phytologist**, [S.L.], v. 234, n. 3, p. 819-826, 5 fev. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.17924>.

PEREIRA, André Luiz Araújo. Identificação de genes de *Citrus sinensis* com expressão dependente da proteína PthA de *Xanthomonas citri* e isolamento de elementos cis regulatórios ligantes de PthA. 2011. 135 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/314050>>

ROSSIER, Ombeline; ACKERVEKEN, Guido van Den; BONAS, Ulla. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 828-838, nov. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02173.x>.

SAUR, I.M.L.; PANSTRUGA, R.; SCHULZE-LEFERT, P.. NOD-like receptor-mediated plant immunity: from structure to cell death. **Nature Reviews Immunology**(2020). Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00473-z>

SCHENSTNYI, Kyrylo; STRAUß, Annett; DRESSEL, Angela; MORBITZER, Robert; WUNDERLICH, Markus; ANDRADE, Ana Gabriela; PHAN, Trang-Thi-Thu; AGUILERA, Paloma de Los Angeles; BRANCATO, Caterina; BERENDZEN, Kenneth Wayne. The tomato resistance gene Bs4 suppresses leaf watersoaking phenotypes induced by AvrHah1, a transcription activator-like effector from tomato-pathogenic xanthomonads. **New Phytologist**, [S.L.], v. 236, n. 5, p. 1856-1870, 3 out. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.18456>.

SCHORNACK, Sebastian; BALLVORA, Agim; GÜRLEBECK, Doreen; PEART, Jack; GANAL, Martin; BAKER, Barbara; BONAS, Ulla; LAHAYE, Thomas. The tomato resistance protein Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense responses to severely truncated derivatives of AvrBs4 and overexpressed AvrBs3. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 46-60, jan. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01937.x>.

SCHORNACK, Sebastian; MOSCOU, Matthew J.; WARD, Eric R.; HORVATH, Diana M.. Engineering Plant Disease Resistance Based on TAL Effectors. **Annual Review Of Phytopathology**, [s.l.], v. 51, n. 1, p. 383-406, 4 ago. 2013. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102255>.

SCHORNACK, Sebastian; PETER, K., BONAS, U.;LAHAYE, T.. Expression Levels of avrBs3-Like Genes Affect Recognition Specificity in Tomato Bs4- But Not in Pepper Bs3-Mediated Perception. **The American Phytopathological Society**, S.i., v. 18, p. 1215-1225, 3 jun. 2005. <https://doi.org/10.1094/mpmi-18-1215>

SCHULTINK, Alex; QI, Tiancong; LEE, Arielle; STEINBRENNER, Adam D.; STASKAWICZ, Brian. Roq1 mediates recognition of the *Xanthomonas* and *Pseudomonas* effector proteins XopQ and HopQ1. **The Plant Journal**, [S.L.], v. 92, n. 5, p. 787-795, 25 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.13715>.

SILVA, A. C. R. da; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C..Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, [s.l.], v. 417, n. 6887, p. 459-463, maio 2002. Springer Science and Business Media LLC.<http://dx.doi.org/10.1038/417459a>.

VARGAS, R.G.; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O., CROCE Filho, J., CARVALHO, S.A., NOCCHI, P.T.R.; NUNES, W.M.C. Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citrina* região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.4, p.235-241, 2013.
<https://doi.org/10.1590/S0100-54052013000400001>

WAN, Li; ESSUMAN, Kow; ANDERSON, Ryan G.; SASAKI, Yo; MONTEIRO, Freddy; CHUNG, Eui-hwan; NISHIMURA, Erin Osborne; DIANTONIO, Aaron; MILBRANDT, Jeffrey; DANGL, JefferyL.. TIR domains of plant immune receptors are NAD+-cleaving enzymes that promote cell death. **Science**, [s.l.], v. 365, n. 6455, p. 799-803, 22 ago. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aax1771>.

WANG, Jizong; HU, Meijuan; WANG, Jia; QI, Jinfeng; HAN, Zhifu; WANG, Guoxun; QI, Yijun; WANG, Hong-wei; ZHOU, Jian-min; CHAI, Jijie. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity. **Science**, [s.l.], v. 364, n. 6435, p. 1-11, 4 abr. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aav5870>.

WANG, Jizong; WANG, Jia; HU, Meijuan; WU, Shan; QI, Jinfeng; WANG, Guoxun; HAN, Zhifu; QI, Yijun; GAO, Ning; WANG, Hong-wei. Ligand-triggered allosteric ADP release primes a plant NLR complex. **Science**, [s.l.], v. 364, n. 6435, p. 1-12, 4 abr. 2019. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aav5868>.

WANG, Junzhu; CHEN, Tianyuan; HAN, Meng; QIAN, Lichao; LI, Jinlin; WU, Ming; HAN, Ting; CAO, Jidong; NAGALAKSHMI, Ugrappa; RATHJEN, John P.. Plant NLR immune receptor Tm-22 activation requires NB-ARC domain-mediated self-association of CC domain. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. e1008475, 27 abr. 2020. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008475>.

WANG, Junzhu; HAN, Meng; LIU, Yule. Diversity, structure and function of the coiled-coil domains of plant NLR immune receptors. **Journal Of Integrative Plant Biology**, [S.L.], v. 63, n. 2, p. 283-296, fev. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.13032>.

WU, Xiujuan; ZHANG, Xuan; WANG, Hongwei; FANG, Rong-Xiang; YE, Jian. Structure-function analyses of coiled-coil immune receptors define a hydrophobic module for improving plant virus resistance. **Journal Of Experimental Botany**, [S.L.], v. 74, n. 5, p. 1372-1388, 6 dez. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erac477>.