

Projeto PIBIC Título: Análise funcional de prolil-isomerases no crescimento celular em plantas induzido por fitobactérias

Laboratório Nacional de Biociências – LNBio

Orientador: Dr. Celso E. Benedetti

Co-orientadora: Dra. Paula Rodrigues Oblessuc

O Brasil se destaca internacionalmente como um importante produtor e exportador de frutas cítricas e seus derivados. A grande maioria das variedades comerciais de citros são hospedeiras de uma infinidade de agentes fitopatogênicos incluindo a bactéria *Xanthomonas citri*, que causa o Cancro Cítrico (Mattos Junior et al., 2005). Apesar das medidas de controle vigentes, o Cancro Cítrico, representa ainda uma grande ameaça aos citricultores, com cinco vezes mais plantas infectadas nas propriedades paulistas que a média dos últimos treze anos (dados do Fundecitrus publicados em www.fundecitrus.com.br). O Cancro Cítrico se caracteriza pela hipertrofia (divisão) e hiperplasia (crescimento) das células hospedeiras em resposta à infecção, levando a um acréscimo anormal das células e conseqüentemente rompimento da epiderme foliar, o que favorece a dispersão da bactéria (Brunnings e Gabriel, 2003). Tal resposta é mediada pela ação dos efetores TAL (transcription activator-like effectors), proteínas que a bactéria injeta dentro da célula da planta e que funcionam como fatores de transcrição. Os efetores TAL ativam a transcrição de genes alvos responsáveis pelo controle do crescimento celular. Mutantes de *X. citri* deficientes na produção de efetores TAL não causam hiperplasia e hipertrofia em citros (Abe e Benedetti, 2016)

A maneira pela qual os efetores TAL controlam a transcrição em citros ainda não é inteiramente conhecida, mas sabe-se que proteínas da hospedeira, incluindo a prolil-isomerase CsCYP, desempenha um papel importante no desenvolvimento do Cancro Cítrico. Plantas de citros deficientes na produção de CsCYP apresentaram maior crescimento celular em resposta à infecção por *X. citri* (Campos et al., 2013). Uma vez que os efetores TAL de *X. citri* interagem e modulam a atividade prolil-isomerase de CsCYP, temos como hipótese que CsCYP modula a transcrição de genes na planta responsáveis pelo crescimento celular (Domingues et al., 2010; Campos et al 2013).

Com o objetivo de entender os mecanismos que levam a este crescimento celular na planta, o grupo pretende utilizar a planta modelo *Arabidopsis thaliana*, uma vez que

esta apresenta ampla gama de mutantes já selecionados, incluindo os mutantes *roc1* e *roc3*, que apresentam inserções nos genes que codificam para as prolil-isomerases ROC1 e ROC3, respectivamente, as quais apresentam alta identidade com a proteína CsCYP de citros.

Em trabalho preliminar, observamos que os mutantes *roc1* e *roc3* apresentam a formação de pústulas quando infectados com a bactéria *X. citri*, porém, numa intensidade maior que o observado em plantas normais (Col-0). Embora a indução de hipertrofia de células em *Arabidopsis* em resposta a infecção por fitobactérias tenha sido reportado como um fenômeno de endo-replicação, ou seja, duplicação do material genético sem divisão da célula (Hamdoun et al., 2013), os dados sugerem que as proteínas ROC1 e ROC3, à semelhança de CsCYP, controla crescimento celular em *Arabidopsis*. De acordo com Hamdoun e colaboradores, o fenômeno de endo-replicação é dependente da resposta de defesa basal mediada pelo receptor de flagelina.

Sendo assim, o presente projeto tem o objetivo de avaliar a resposta de hipertrofia e hiperplasia em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (Col-0) e mutantes *roc1*, *roc3* e *fls2*, infectadas com diferentes linhagens bacterianas, incluindo *P. syringae* e *X. citri*.

Objetivos específicos:

1. Crescer em solo plantas Col-0 e mutantes *roc1*, *roc3* e *fls2*
2. Infectar folhas de plantas com as bactérias: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* linhagem patogênica DC3000, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* linhagem HrcC-, *Xanthomonas citri* linhagem patogênica 306, *Xanthomonas citri* linhagem Δ hrpB2 (que não transloca efetores tipo "TAL"), e mutantes de deleção nos efetores TAL (Δ pthAs).
3. Observar, através de técnicas de microscopia, o desenvolvimento de hipertrofia e / ou hiperplasia celular em folhas infectadas.
4. Utilizar técnicas de coloração nuclear com DAPI ou Hoescht para avaliar endo-replicação em células de folhas infectadas apresentando hipertrofia.
5. Avaliar a transcrição de potenciais genes alvos de efetores TAL por RT-PCR

Bibliografia

Abe VY, Benedetti CE. (2016) Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding

elements of citrus canker susceptibility genes. *Mol Plant Pathol*.
DOI: 10.1111/mpp.12359

Brunnings AM, Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol* 4: 141-57.

Campos BM, Sforça ML, Ambrosio AL, Domingues MN, Brasil de Souza Tde A, Barbosa JA, Paes Leme AF, Perez CA, Whittaker SB, Murakami MT, Zeri AC, Benedetti CE. (2013) A redox 2-Cys mechanism regulates the catalytic activity of divergent cyclophilins. *Plant Physiol*. 162:1311-23

Cappelletti, P. a., dos Santos, R. F., do Amaral, A. M., Homem, R. A., dos Santos Souza, T., Machado, M. a., & Farah, C. S. (2011). Structure-function analysis of the HrpB2-HrcU interaction in the *Xanthomonas citri* type III secretion system. *PLoS ONE*, 6(3). doi:10.1371/journal.pone.0017614

Domingues MN, de Campos BM, de Oliveira ML, de Mello UQ, Benedetti CE (2012) TAL Effectors Target the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II (CTD) by Inhibiting the Prolyl-Isomerase Activity of a CTD-Associated Cyclophilin. *PLoS One*. 2012;7(7):e41553

Hamdoun, S., Liu, Z., Gill, M., Yao, N., & Lu, H. (2013). Dynamics of Defense Responses and Cell Fate Change during *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* Interactions. *PLoS ONE*, 8(12), e83219. doi:10.1371/journal.pone.0083219

Mattos Junior D, De Negri JD, Pio RM, Pompeu Junior J (2005) *Citros*; edit. Instituto Agrônômico e Fundag.