



ESALQ

Universidade De São Paulo

Escola Superior De Agricultura “Luiz De Queiroz”

Laboratório de Genética e Imunologia de Plantas

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

**Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Ciências
Biológicas como parte do requisito de obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

Aluna: Amanda Nicolau Minetto

Orientador: Prof. Paulo J. P. L. Teixeira

Piracicaba-SP

2023

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	3
2. INTRODUÇÃO	4
2.1 O sistema Imune Vegetal	4
2.2. Reconhecimento de efetores por receptores NLR	6
2.3. A Importância do gênero <i>Xanthomonas</i> na agricultura	9
2.4. A NLR Bs4 de tomateiro reconhece efetores TAL de <i>Xanthomonas</i>	10
2.5. <i>Xanthomonas citri subsp. citri 306</i> é reconhecida pelo tomateiro	12
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
4. CRONOGRAMA	15
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 Resumo do Plano Experimental	15
5.2 Material biológico e condições de crescimento	16
5.3 Clonagem dos efetores TAL de <i>Xcc306</i> no vetor pVSP61.....	17
5.4 Transformação de <i>X. euvesicatoria 85-10</i> com efetores TAL de <i>Xcc306</i>	17
5.5 Inoculação de tomateiro com <i>X. euvesicatoria 85-10</i> carregando efetores TAL de <i>Xcc306</i>	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
FOLHA DE ASSINATURAS	24

1. RESUMO

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 efector 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 projeto testará se o receptor Bs4 tem alguma participação na resposta imune do tomateiro contra *Xcc306*. Para isso, os quatro efetores TAL de *Xcc306* serão clonados e transferidos para *X. euvesicatoria* 85-10, a qual é naturalmente patogênica em tomateiros. Ensaio de inoculação bacteriana em tomateiro serão então realizados para testarmos se algum dos TALs de *Xcc306* confere avirulência a *X. euvesicatoria* 85-10. O mesmo experimento será realizado com o tomateiro mutante *bs4 S. lycopersicum*, o qual não possui o 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: receptores NLRs, efetores TAL, *Xanthomonas*.

2. INTRODUÇÃO

2.1 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 PRRs (*pattern recognition receptors*), os quais reconhecem moléculas de microrganismos no meio extracelular. O segundo mecanismo de percepção dependente de receptores citoplasmáticos denominados NLRs (*nucleotide binding–leucine-rich repeat*), que são responsáveis pelo reconhecimento de moléculas efetoras no interior da célula vegetal (figura 1) (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 MTI (*MAMP-triggered immunity*; também chamada de PTI – *PAMP-triggered immunity*), 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 efector (ETS; *effector-triggered susceptibility*). A célula hospedeira, por sua vez, utiliza a segunda camada de receptores para conter o avanço do patógeno. Esses receptores citoplasmáticos (NLRs) serão capazes de reconhecer moléculas efetoras provenientes de patógenos e irão desencadear uma resposta imunológica denominada 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 1).

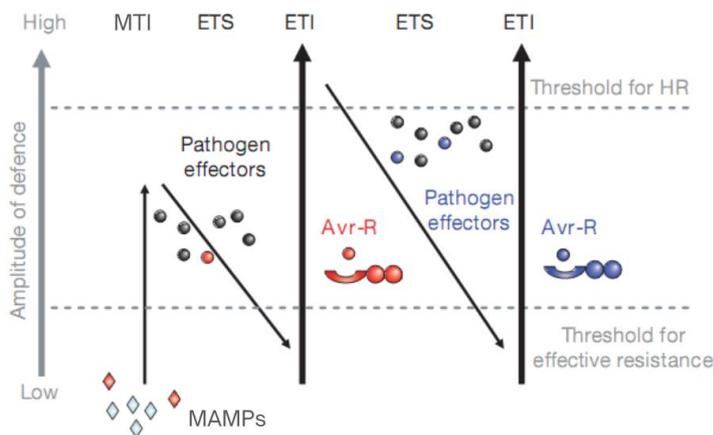


Figura 1: O modelo zigue-zague ilustra a alternância entre susceptibilidade e resistência de plantas a patógenos.

Neste esquema, o resultado da interação (resistência ou susceptibilidade) depende de componentes da planta e do patógeno. Na fase 1, 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, os patógenos

bem-sucedidos utilizam efetores que interferem na MTI, ou permitem a dispersão de patógenos, resultando em susceptibilidade desencadeada por efector (ETS). Na fase 3, um efector (indicado como um círculo vermelho) é reconhecido por uma proteína NLR (codificada por um gene *R*), ativando a imunidade desencadeada por efector (ETI), uma versão amplificada da MTI que muitas vezes passa um limiar para indução da resposta de hipersensibilidade (HR; morte celular). Na fase 4, são selecionados isolados de patógenos que perderam o efector 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).

Os patógenos continuam evoluindo, sofrendo mutações, perdendo ou alterando os efetores já existentes enquanto a seleção natural é responsável por permitir o sucesso evolutivo dos mais adaptados. Os genes de resistência da planta que codificam as proteínas de reconhecimento são conhecidos como genes *R*. 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 co-evoluem de maneira que a competição se mantenha 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).

2.2. Reconhecimento de efetores por receptores NLR

Como descrito acima, NLRs são receptores citoplasmáticos capazes de reconhecer moléculas efetoras de diferentes patógenos através de interações específicas de forma direta (contato direto com o efector) 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), associada à morte celular programada (MONTEIRO & NISHIMURA, 2018).

Os NLRs possuem uma estrutura típica que consiste em uma região central contendo 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. Além disso, NLRs possuem um domínio N-terminal variável, o qual pode ser um TIR (*Toll-interleukin-1 receptor*), um 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 ADP, o NLR se encontra em uma conformação fechada e inativa. Porém, o receptor assume uma conformação aberta e ativa ao se ligar ao ATP (figura 2) (MONTEIRO & NISHIMURA, 2018).

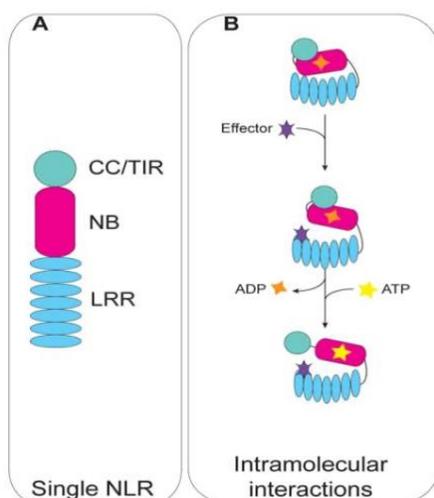


Figura 2: Representação de um receptor NLR típico de plantas. (A) Na parte superior, a região N-terminal contendo um domínio variável (CC/TIR), na região central o domínio NB (sítio de ligação ao nucleotídeo) e na parte inferior o domínio LRR na região C-terminal. (B) Observa-se na parte superior da imagem a NLR em seu estado inativo ligada a um ADP. Quando o receptor entra em contato com o efector, 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)

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 efector AvrAC da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, sofre uma 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 (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 (WANG et al., 2019). Já existem estudos que buscam descobrir se os demais CNLs funcionam de forma similar a ZAR1. Trabalhos publicados no ano de 2022 mostraram que o receptor CNL Sr35 de trigo (*Triticum monococcum*) forma um complexo pentamérico com o efector AvrSr35 do patógeno da ferrugem do caule do trigo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) denominado resistossomo Sr35, o qual apresenta semelhanças estruturais marcantes com resistossomo ZAR1 de *A. thaliana* (FÖRDERER et al., 2022; ZHAO et al., 2022).

Por outro lado, a ativação de TIR-NLRs leva à formação de uma estrutura TIR tetramérica (figura 4) com atividade de nicotinamida adenina dinucleotídeo glicohidrolase (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 nucleicos, gerando metabólitos de nucleotídeos estruturalmente diversificados que podem atuar como segundos 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).

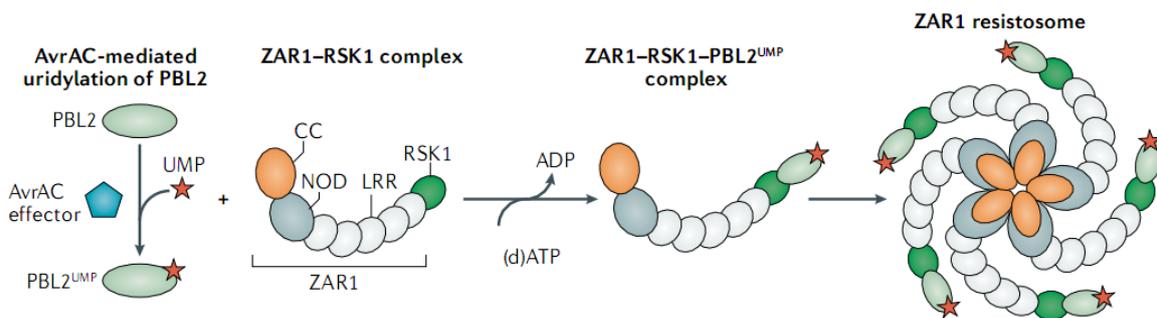


Figura 3: Representação esquemática da formação do resistossomo ZAR1. O efector de *Xanthomonas* AvrAC uridila a quinase PBL2 de *Arabidopsis thaliana*. PBL2 uridilado (PBL2^{LUMP}) associa-se à pseudoquinase RSK1 de *A. thaliana* ligada ao receptor de oligomerização de ligação ao nucleotídeo (domínio 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 – PBL2^{LUMP} 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).

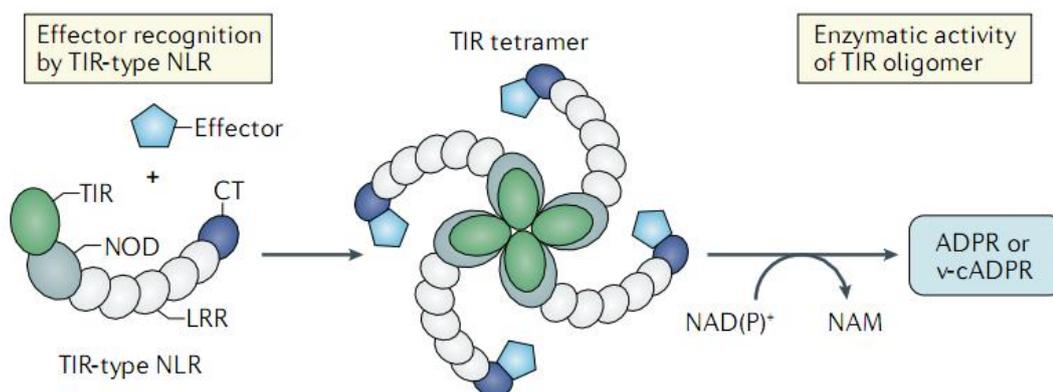


Figura 4: Formação do complexo TIR- tetramérico. O reconhecimento direto de um efector de avirulência do patógeno pela repetição rica em leucina (LRR) e domínios carboxi-terminal (CT) de um domínio do receptor canônico de Toll / interleucina-1 (TIR) contendo o domínio de oligomerização de ligação aos 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). 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 destes componentes na ativação de NLRs é ainda desconhecida.

2.3. 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 (MARCUIZZO, 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 conhecidos 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).

2.4. 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 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 (BOGDANOVE et al., 2010).

A estrutura de um efector TAL típico consiste em três partes principais (SCHORNACK et al., 2013): (1) a porção N-terminal responsável pela secreção e translocação do efector para o interior da célula do hospedeiro; (2) uma sequência de resíduos de aminoácidos repetitiva e variável que determina a especificidade do efector (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 (figura 5).

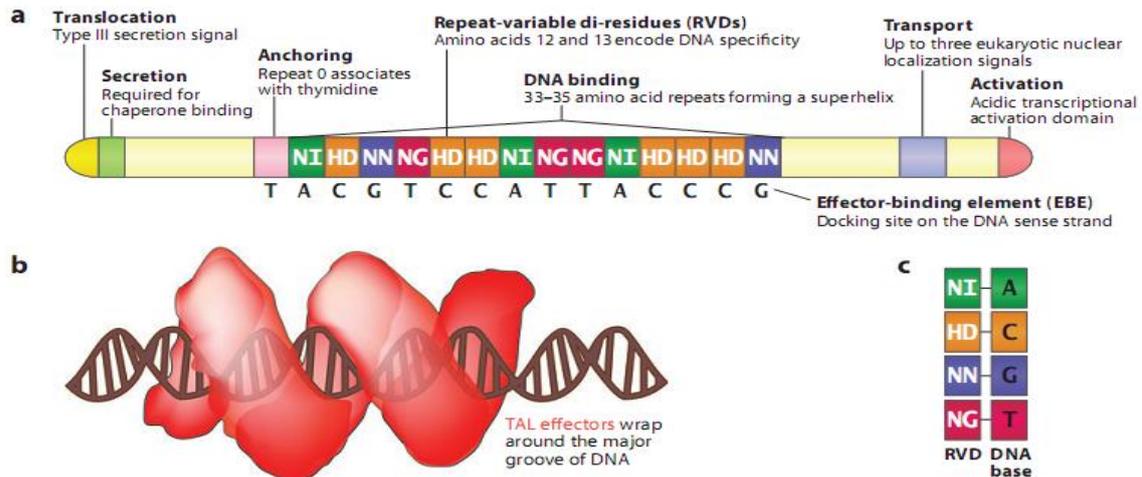


Figura 5: Estrutura dos efetores do tipo ativador de transcrição (TAL). (a) Os efetores TAL consistem em três domínios funcionais. O N-terminal é necessário para secreção e translocação para o interior da célula do hospedeiro. O domínio central consiste em repetições com di-resíduos variáveis de repetição de aminoácidos (RVDs) que se associam a uma sequência de DNA específica. O C-terminal confere a ativação transcricional de genes do hospedeiro. (b) A estrutura terciária das proteínas efetoras TAL consiste em uma super hélice que serpenteia em torno do sulco principal do DNA de fita dupla, interagindo com as bases das fitas de DNA. (c) Um conjunto mínimo de RVDs e suas preferências de base de DNA são mostrados. Figura extraída de SCHORNACK et al., (2013).

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 (figura 6) (SCHORNACK et al., 2013).

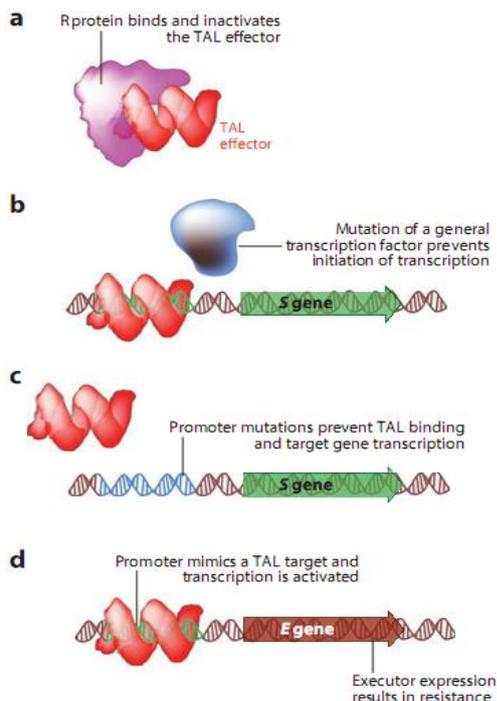


Figura 6: Mecanismos de resistência das plantas contra efetores do tipo ativador de transcrição (TAL). (a) O reconhecimento mediado pela proteína de resistência a doenças das plantas (R) de um efetor de TAL resulta em resposta de hipersensibilidade (HR) e resistência. (b) Uma variante da subunidade geral do fator de transcrição TFIIA γ não permite a ativação da transcrição dos genes do hospedeiro acionada por efetor TAL. A falta de expressão suficiente do gene de suscetibilidade alvo provavelmente interfere na virulência. (c) Os promotores de um gene de susceptibilidade ao hospedeiro (gene S) variam no elemento de ligação ao efetor (EBE) e impedem a ativação da transcrição pelos efetores de TAL. A falta de expressão do gene S resulta em uma incapacidade de sustentar a infecção. (d) O efetor TAL se liga a um promotor que é acoplado a um gene executor (gene E). A ativação desencadeada pelo efetor de TAL desse gene leva à HR e resistência. Fonte: (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).

2.5. *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 Δ *hrpB2* (figura 7). *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. Neste contexto, o aluno de iniciação científica Caio Vinícius Mendes (Processo Fapesp 20/04773-8) vem investigando quais dos 30 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), hipotetizamos que o receptor Bs4 do tomateiro desempenhe um papel no reconhecimento e ativação de uma resposta imune efetiva contra *Xcc306*. Assim, este projeto visa 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 que determinam a incompatibilidade entre *Xcc306* e plantas não-hospedeiras.

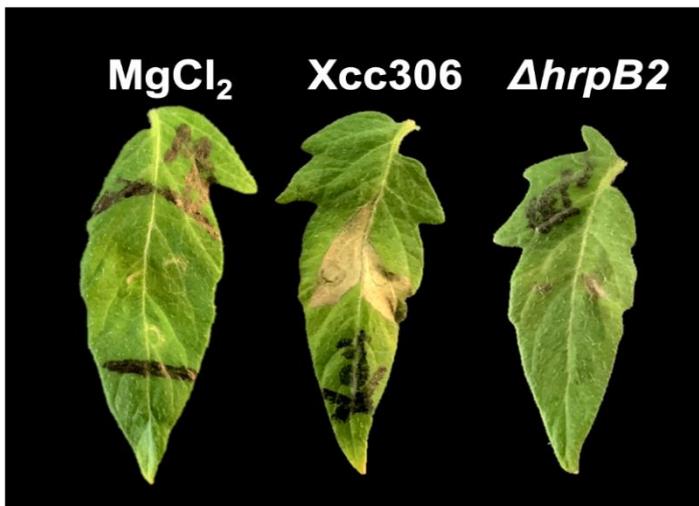


Figura 7: Folhas de tomateiro (*S. lycopersicum*) inoculadas com *Xanthomonas citri subsp. citri* 306. Pode-se observar HR nas folhas de tomateiro inoculadas com *Xcc306* selvagem, porém nas folhas inoculadas com o mutante *Xcc306* Δ *hrpB2* não houve resposta de hipersensibilidade. A solução de MgCl₂ (veículo da bactéria) foi utilizada como controle negativo.

2. JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Genética e Imunologia de Plantas da ESALQ/USP, coordenado pelo Prof. Paulo Teixeira, foi um dos 24 contemplados com o apoio à pesquisa através da segunda chamada de propostas do Instituto Serrapilheira. Posteriormente, o projeto foi um dos três selecionados para a renovação do apoio por mais três anos. Neste projeto, nosso grupo tem buscado entender os mecanismos moleculares que governam a chamada resistência de não-hospedeiro, com especial ênfase ao papel do reconhecimento de efetores por NLRs. Utilizando a bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri* como modelo (um patógeno de citros), nosso grupo avalia a hipótese de que plantas não-hospedeiras reconhecem múltiplos efetores desta bactéria simultaneamente, o que torna a resistência difícil de ser quebrada e, portanto, duradoura. Neste contexto, identificamos uma forte

resposta de hipersensibilidade em tomateiro inoculado com *Xcc306* (figura 7). Essa resposta requer a presença de efetores da bactéria no interior da célula do hospedeiro e, portanto, sugere a participação de receptores NLRs. Uma vez que o tomateiro possui um receptor TIR-NLR (Bs4) capaz de reconhecer o efector TAL avrBs4 de *Xanthomonas euvesicatoria*, iremos avaliar se este receptor possui alguma participação no reconhecimento de *Xcc306*. Os quatro efetores TAL de *Xcc306* (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 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. Este projeto aborda uma importante pergunta no contexto de uma iniciativa maior que visa entender quais componentes moleculares do tomateiro (e de outras plantas não-hospedeiras) são responsáveis pela resistência contra *Xcc306*. Trata-se de um projeto de pesquisa básica que visa testar uma hipótese que irá expor o aluno a uma grande variedade de técnicas de biologia molecular. Em última instância, a identificação de receptores imunes efetivos contra este patógeno poderá embasar esforços futuros que visem a obtenção, por biotecnologia, de citros resistentes ao cancro, doença causada por *Xcc306*.

3. OBJETIVOS

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

- Clonagem dos quatro efetores TAL de *Xcc306* no vetor pVSP61;
- Transformação de *X. euvesicatoria 85-10* com os efetores TAL de *Xcc306*;
- Avaliação da compatibilidade da interação entre o tomateiro (selvagem e mutante *bs4* CRISPR/Cas9) e os transformantes de *X. euvesicatoria 85-10* carregando os efetores TAL de *Xcc306*.

4. CRONOGRAMA

Atividades	Meses					
	1	2	3	4	5	6
Clonagem dos efetores TAL de <i>Xcc306</i> no vetor pGWB614	■	■				
Clonagem dos efetores TAL de <i>Xcc306</i> no vetor pVSP61		■	■			
Transformação de <i>X. euvesicatoria</i> 85-10 com efetores TAL de <i>Xcc306</i>				■		
Inoculação de tomateiro com <i>X. euvesicatoria</i> 85-10 carregando efetores TAL de <i>Xcc306</i>					■	
Redação do Trabalho de Conclusão de Curso						■

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Resumo do Plano Experimental

Neste projeto, iremos avaliar se o receptor Bs4 do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) é capaz de reconhecer efetores TAL de *Xcc306* (PthAs). Para isso, utilizaremos um sistema experimental baseado na bactéria *X. euvesicatoria* 85-10, a qual é virulenta em tomateiro, para “entregar” os efetores nas células da planta no contexto de uma infecção. Inicialmente, iremos clonar cada um dos genes *PthA* com seu promotor no vetor pVSP61. Plasmídeos carregando os genes *PthA* serão então transformados em *X. euvesicatoria* 85-10 de forma a obtermos quatro transformantes (cada um carregando um gene *PthA* diferente). Os transformantes serão então utilizados em ensaios de infecção de tomateiro de forma a testar se a presença do gene *PthA* confere avirulência à *X. euvesicatoria* 85-10. Bactérias transformadas com *avrBs4* serão utilizadas como controle positivo para ativação de Bs4. Ainda, o tomateiro *S. lycopersicum* mutante *bs4* o qual foi gerado por CRISPR/Cas9 e obtido por meio de uma colaboração com o Prof. Thomas Lahaye (Universidade de Tübingen, Alemanha) será utilizado como controle negativo, uma vez

que esta planta não carrega o gene *Bs4*. Um resumo do plano experimental é apresentado na figura 8.

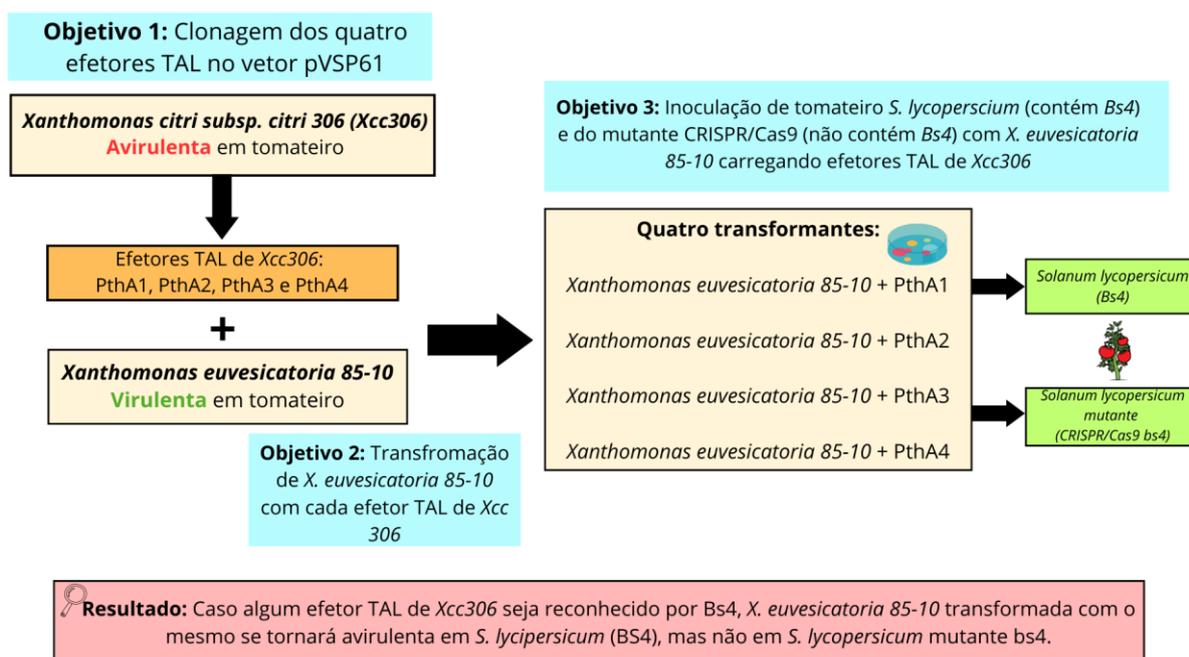


Figura 8. Estratégia experimental adotada neste projeto. Os quatro efetores PthAs de *Xcc306* serão clonados, juntamente com seus promotores, no vetor pVSP61. Cada gene *PthA* será então transferido para *X. euvesicatoria 85-10*, a qual é naturalmente patogênica no tomateiro. Ensaios de infecção de plantas serão então realizados para verificarmos se algum dos quatro efetores PthAs de *Xcc306* confere avirulência a *X. euvesicatoria 85-10* especificamente em *S. lycopersicum*, o qual carrega o receptor *Bs4*.

5.2 Material biológico e condições de crescimento

Neste projeto, utilizaremos as bactérias *Xanthomonas citri. subsp. citri 306 (Xcc306)* e *Xanthomonas euvesicatoria 85-10*. *Xcc306* é um importante patógeno de citros e carrega quatro efetores TAL (PthAs) em seu genoma (ABE et al., 2016; SILVA et al., 2002). A estirpe 85-10 de *X. euvesicatoria* é virulenta em pimenteira e tomateiro e apresenta um efector TAL (*avrBs3*) em seu genoma. Essa estirpe não é reconhecida pelo receptor *Bs4* de tomateiro por não carregar o efector *avrBs4* (SCHORNACK et al., 2013). O cultivo das bactérias se dará a 28°C em placas de Petri contendo meio 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) contendo 100 µg/mL de ampicilina (*Xcc306*) ou 100 µg/mL de rifampicina (*X. euvesicatoria 85-10*).

O cultivo do tomateiro domesticado (*S. lycopersicum* FL8000; *BS4*) e mutante CRISPR/Cas9 (*S. lycopersicum*; *bs4*) se dará em casa de vegetação localizada na ESALQ/USP, sob temperatura média de 25°C e umidade de 70% em Substrato Vegetal

“Biogrow Germina/Enraíza Premium”, cujo pH é de 5,5, capacidade de retenção de água (CRA) de 247,6%, condutividade elétrica (CE) igual a 0,8 e densidade de matéria seca de 166,7 kg/m². Apresenta em sua composição casca de Pinus, turfa de *Sphagnum*, perlita, areia, correção de acidez e fertilizante de base.

5.3 Clonagem dos efetores TAL de *Xcc306* no vetor pVSP61

Nosso laboratório teve 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). A partir desse material, realizaremos a transformação de células eletrocompetentes da cepa Top10 por meio de eletroporação com os genes *PthAs* contidos no vetor de entrada (pENTR), extrairemos DNA plasmidial das células transformadas e prepararemos as amostras para o sequenciamento Sanger. Após analisar os resultados, utilizaremos esse material em reações LR do procedimento de clonagem *Gateway*, transferindo os genes de interesse para o vetor de expressão pGWB614. O qual será utilizado para transformar células eletrocompetentes da cepa Top10 por meio de eletroporação. Feito isso, será extraído o DNA plasmidial e enviado para o sequenciamento a fim de confirmar as sequências. Posteriormente, os genes de interesse serão transferidos para plasmídeo pVSP61 através da reação *Gateway LR* (ThermoScientific). O plasmídeo pVSP61 é um *shuttle vector* que pode ser propagado tanto em *Escherichia coli* quanto em *Xanthomonas spp.* Os procedimentos de transformação de *E. coli* para propagação de plasmídeo se dará por eletroporação. A extração de plasmídeos será realizada pelo método da lise alcalina. Ambos são procedimentos rotineiros em laboratórios de biologia molecular.

5.4 Transformação de *X. euvesicatoria* 85-10 com efetores TAL de *Xcc306*

Cada um dos quatro genes *PthA* clonados no vetor pVSP61 será transferido para a bactéria *X. euvesicatoria* 85-10, a qual é naturalmente patogênica em tomateiro. O gene *avrBs4* da estirpe 82-8 de *X. euvesicatoria* (reconhecida por *Bs4*) será também transferido para *X. euvesicatoria* 85-10 de forma a constituir um controle nos ensaios de inoculação de tomateiro (descrito abaixo). A transformação se dará por eletroporação segundo o protocolo descrito por Amaral et al. (2005). Células transformadas serão selecionadas em meio 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) contendo rifampicina (100 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL) após incubação a 28°C por 48 horas.

5.5 Inoculação de tomateiro com *X. euvesicatoria* 85-10 carregando efetores TAL de *Xcc306*

Colônias de *X. euvesicatoria* 85-10 carregando os genes *PthA* de *Xcc306* serão estriadas em meio sólido NYGA contendo os antibióticos apropriados e cultivadas a 28°C. Após 48h, as bactérias serão ressuspendidas em MgCl₂ 10 mM e diluídas para uma OD_{600nm} de 0,4. Folhas de tomateiro serão inoculadas na face abaxial utilizando-se uma seringa sem agulha e monitoradas por até uma semana quanto ao desenvolvimento de morte celular indicativa de HR. *X. euvesicatoria* 85-10 transformada com o vetor pVSP61 vazio (i.e., sem efetores) ou carregando um gene irrelevante (e.g, GFP) serão utilizadas como controle (i.e., não causarão HR no tomateiro). Tomateiros *S. lycopersicum* mutantes para o gene *Bs4*, que foram gerados por CRISPR/Cas9 e obtidos por meio de uma colaboração com o Prof. Thomas Lahaye (Universidade de Tübingen, Alemanha), serão utilizados como controle incapaz de reconhecer efetores TAL. A ocorrência de HR em *S. lycopersicum*, mas não no mutante será indicativo da participação do receptor Bs4 no reconhecimento do efector PthA em questão. Ensaios de qPCR serão realizados para confirmar a expressão dos genes *PthA* por *X. euvesicatoria* 85-10 durante as inoculações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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>

AMARAL, Alexandre M. do; TOLEDO, Cristiane P.; BAPTISTA, Juliana C.; MACHADO, Marcos A..Transformation of *Xanthomonasaxonopodispv. citri*byelectroporation. **Fitopatologia Brasileira**, [s.l.], v. 30, n. 3, p. 292-294, jun. 2005. FapUNIFESP (SciELO).<http://dx.doi.org/10.1590/s0100-41582005000300013>

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>.

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.cecm.usp.br/~ltrabuco/escritos/redqueen.pdf>. Acesso em: 5 maio 2020.

BONARDI, Vera; DANGL,JefferyL..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>.

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, 15 ago. 2013. American Association for the Advancement of Science (AAAS).<http://dx.doi.org/10.1126/science.1236011>

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

FÖRDERER, Alexander; LI, Ertong; LAWSON, Aaron W.; DENG, Ya-Nan; SUN, Yue; LOGEMANN, Elke; ZHANG, Xiaoxiao; WEN, Jie; HAN, Zhifu; CHANG, Junbiao. A

wheat resistosome defines common principles of immune receptor channels. **Nature**, [S.L.], v. 610, n. 7932, p. 532-539, 26 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-022-05231-w>.

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, Shoucai; 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/10.1>

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>

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.

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 citrisubsp. citrina* região Noroeste Paranaense, em condições de campo. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.4, p.235-241, 2013.

WAN, Li; ESSUMAN, Kow; ANDERSON, Ryan G.; SASAKI, Yo; MONTEIRO, Freddy; CHUNG, Eui-hwan; NISHIMURA, Erin Osborne; DIANTONIO, Aaron; MILBRANDT, Jeffrey; DANGL, Jeffery L. 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>.

ZHAO, Yan-Bo; LIU, Meng-Xi; CHEN, Tao-Tao; MA, Xiaomin; LI, Ze-Kai; ZHENG, Zichao; ZHENG, Si-Ru; CHEN, Lifei; LI, You-Zhi; TANG, Li-Rui. Pathogen effector AvrSr35 triggers Sr35 resistosome assembly via a direct recognition mechanism. **Science Advances**, [S.L.], v. 8, n. 36, p. 1-11, 9 set. 2022. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abq5108>.

FOLHA DE ASSINATURAS

AMANDA NICOLAU MINETTO

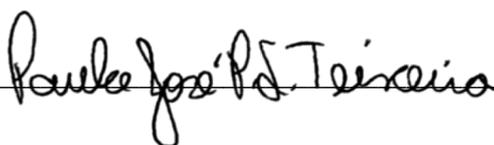
**Avaliação do papel do receptor imunológico Bs4 do tomateiro
no reconhecimento da bactéria *Xanthomonas citri subsp. citri***

**Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Ciências
Biológicas como parte do requisito de obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas.**

Piracicaba, 06 de Maio de 2023.



Discente: Amanda Nicolau Minetto



Orientador: Paulo José Pereira Lima Teixeira



COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA - ESALQ/USP

CERTIFICAÇÃO DE DOCENTE

A Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (CEAP), Ad Referendum, **CERTIFICOU** o Prof. Dr. **Paulo José Pereira Lima Teixeira**, Departamento de Ciências Biológicas, pelo período de **02/09/2022 à 01/09/2025**.

Piracicaba, 30 de agosto de 2022.

Prof^a. Dr^a. Wanessa Melchert Mattos
Presidente da CEAP/ESALQ/USP