PAULA CRISTINA GASPERAZZO TURRINI

INFLUÊNCIA DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS EM LINHAGENS DE *XANTHOMONAS ORYZAE*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Marie-Anne Van Sluys

Versão original

São Paulo
2016

RESUMO

Turrini PCG. Influência de elementos genéticos móveis em linhagens de *Xanthomonas oryzae*. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Elementos móveis influenciam expressivamente a evolução do grupo Bacteria, uma vez que são integrantes importantes do processo de geração da variabilidade genética e promovem a diversidade da população frente à estocasticidade do ambiente. Nesta tese, investigamos a influência de elementos genéticos móveis em linhagens de *X. oryzae* sob três diferentes aspectos. Primeiramente, investigamos a transferência horizontal de um *operon* de biossíntese do fitormônio GA_4, adquirido exclusivamente pelo patovar *oryzicola* (*Xoc*). A importância da produção do fitormônio GA_4 por *Xoc* é indicada pela alta prevalência do *operon* em diferentes populações, e pela ampla distribuição geográfica em um amplo perído de tempo. Também abordamos a influência de elementos genéticos móveis mais amplamente no genoma de *X. oryzae*, descrevendo como elementos de transposição, representados por elementos do tipo IS, são capazes de interferir em um sistema central do metabolismo bacteriano, como o sistema de reparo de DNA. Por fim, descrevemos um novo elemento do tipo MITE encontrado em *X. oryzae* e analisamos sua organização, distribuição, filogenia, seu nível transcricional e o potencial funcional deste elementos na interação de *X. oryzae* com seu hospedeiro *O. sativa*. Nosso conjunto de resultados reitera a importância dos elementos de transposição no aumento de variabilidade genética de populações, e dessa forma, infere sobre seu papel relevante na diversificação em *X. oryzae*. Descrevemos a variabilidade gerada, exploramos as consequências da amplificação de elementos de transposição nesta espécie e evidenciamos a complexidade desta variação em nível populacional.

Palavras-chave: *Xanthomonas oryzae.* Elementos de transposição. Elementos IS. MITE. Reparo de DNA.

ABSTRACT

Turrini PCG. Influence of mobile genetic elements in *Xanthomonas oryzae* lineages. [Ph.D. Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Mobile elements are genomic components that trigger genetic variability. They promote the diversity of the population against the stochasticity of the environment, significantly influencing the evolution of the Bacteria group. In this thesis, we investigate the influence of mobile genetic elements on *X. oryzae* lineages under three different aspects. First, we investigated the horizontal transfer event of an operon coding the biosynthesis of the phythormome GA_4, acquired exclusively by the pathovar *oryzicola* (*Xoc*). The importance of the production of the phytohormone GA_4 by *Xoc* is indicated by its high prevalence in different populations, in a wide geographic distribution and in a large time period. We also address the influence of mobile genetic elements more comprehensively in the *X. oryzae* genome. We describe how transposable elements, represented by IS elements, are capable of interfering in a central system of bacterial metabolism, such as the DNA repair system. Finally, we describe a new MITE element found in *X. oryzae* and analyzed its organization, distribution, phylogeny and transcriptional level. We also speculate its function in the *X. oryzae*-*Oryza sativa* interaction. Our results reiterate the importance of transposable elements enriching genetic variability of populations and infers on their relevant role in the diversification of *X. oryzae* lineage. We describe the variability transposable elements confers, explore the consequences resulting from the amplification of transposition elements in the *X. oryzae* species and we show the complexity of this variation at the population level.

Keywords: *Xanthomonas oryzae*. Transposable elements. IS elements. MITE. DNA repair.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Microorganismos ocupam os mais diversos habitats e exibem uma enorme diversidade metabólica, em estrutura e composição celulares, estilos de vida e nichos ecológicos (Arber, 2000). A expressiva capacidade adaptativa que garante o sucesso evolutivo deste grupo depende de processos de geração da variabilidade genética que ocorrem em nível celular individual.

Elementos móveis influenciam a evolução do grupo Bacteria. São integrantes importantes do processo de geração da variabilidade genética e promovem a diversidade da população frente à estocasticidade do ambiente.

Neste projeto de Doutorado intitulado ´**Influência de elementos genéticos móveis em linhagens de *Xanthomonas oryzae***´ investigamos como elementos de transposição podem ter influenciado a história evolutiva *Xanthomonas oryzae* e contribuído para o processo de diversificação desta linhagem.

1.1 Características de *Xanthomonas oryzae*

O gênero *Xanthomonas* compõe a família Xanthomonadaceae, dentro do grupo Gamaproteobacteria. Membros deste gênero são majoritariamente fitopatógenos que podem apresentar um elevado grau de especificidade quanto ao hospedeiro vegetal e tecido de colonização. Aproximadamente 400 espécies vegetais de mono- ou dicotiledônias servem como hospedeiros paras as 27 espécies até hoje conhecidas de *Xanthomonas* (Lu et al., 2008).

Como exemplo, podemos citar *Xanthomonas campestris* que infectam diferentes brassicáceas e solanáceas, *X. citri* pv. *citri* que causa a doença do cancro em espécies de citros, *X. albilineans*, causadora da escaldadura-das-folhas em cana-de-açúcar, e *Xanthomonas oryzae*, que infectam especificamente culturas de arroz.

Espécies de *Xanthomonas* podem ser compostas por múltiplas variantes patogênicas (patovares, pv.). Dentro uma mesma espécie, diferentes patovares são assim classificados porque colonizam diferentes hospedeiros (como *X. campestris* pv. *campestris* e *X. campestris* pv. *carotae*, que infectam brássicas e cenoura, respectivamente) ou porque apresentam diferentes sintomatologias em uma mesma espécie vegetal. A espécie *Xanthomonas oryzae* é composta pelos patovares *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. oryzae* pv. *oryzicola*, daqui em diante referidos como *Xoo* e *Xoc* por toda a tese. Causam, respectivamente, as doenças *crestamento foliar bacteriana* e *estriamento foliar bacteriano* (do inglês, *bacterial blight* e *bacterial leaf streak*) em culturas de arroz (*Oryza sativa* L.). Além de *O. sativa*, somente *Leersia oryzoides*, *L. oryzoides* var. *japonica* e *Zizania latifolia* foram reportadas como hospedeiros de *Xoo* (Mew et al., 2014).

Embora *Xoo* e *Xoc* sejam intimamente relacionados filogeneticamente e possuírem alta especificidade com o hospedeiro, o processo de infecção é marcadamente distinto. O patovar *oryzae* (*Xoo*) invade o hospedeiro por hidatódios das pontas e margens da folha. São capazes de colonizar os espaços intercelulares e atingem o xilema, sistema vascular pelo qual *Xoo* veicula por toda a planta, comprometendo sistemicamente o hospedeiro (Figura 1.1A).

O patovar *oryzicola* (*Xoc*) penetra na folha principalmente pelos estômatos. As bactérias se proliferam na cavidade sub-estomatal e colonizam os espaços intercelulares do tecido mesofílico. Diferentemente de *Xoo*, *Xoc* é incapaz de invadir o sistema vascular (xilema), caracterizando-se como uma linhagem de menor agressividade (Niño-Liu et al., 2006; Ryan et al., 2011). Ferimentos no tecido vegetal também representam uma importante porta de entrada bacteriana para ambos patovares.

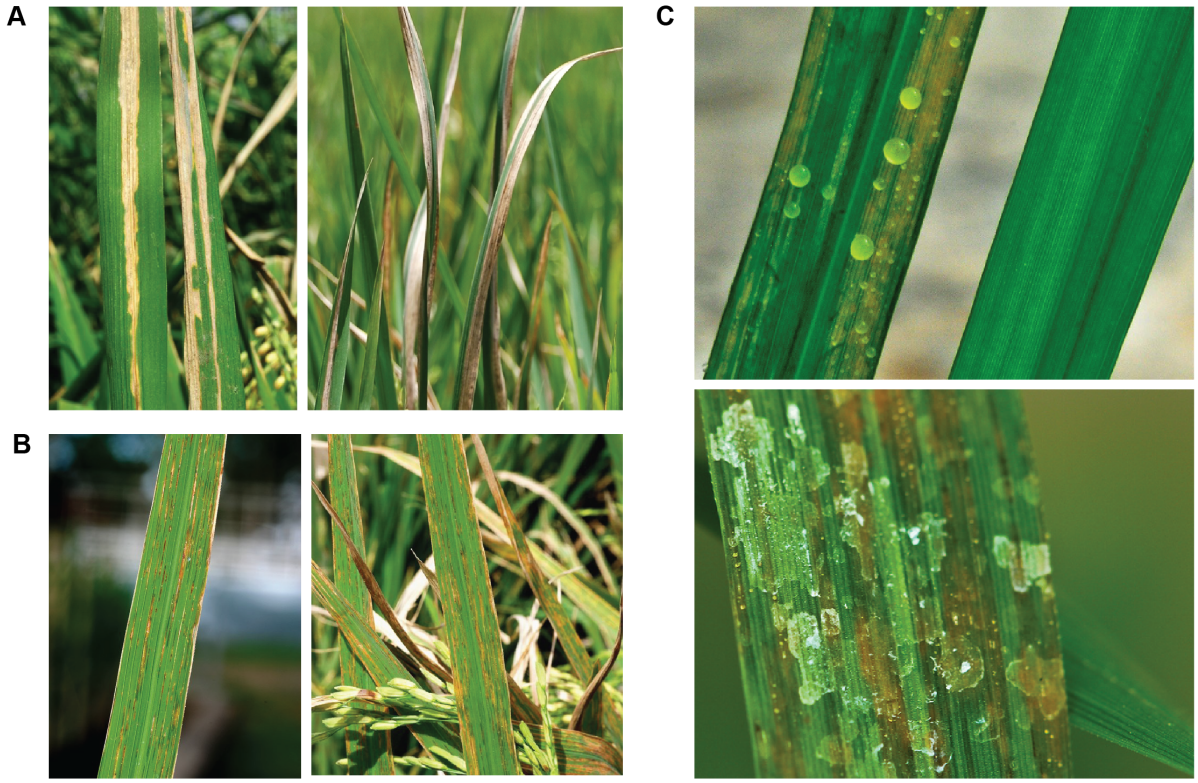

Figura 1.1 - Sintomas de *Xanthomonas oryzae* em plantas de arroz. A) Crestamento foliar causado por *Xoo* em folhas de arroz. As lesões são feixes úmidos que se iniciam nas margens e pontas e progridem até a base foliar. B) Lesões lineares, localizadas em tecidos entre os vasos foliares causados por *Xoc*, como estrias nas folhas. As lesões são translúcidas quando expostas contra luz. C) em condições de umidade, gotículas amarelas colonizadas por *Xoo* podem ser observadas na superfície foliar (cima) e quando secam, formam pequenas placas amarelas dentro da folha (baixo). Imagens do website Rice Knowlegde Bank desenvolvido pelo International Rice Research Institute (IRRI), Filipinas.

Os sintomas iniciais observados na planta também podem ser utilizados para a distinção entre *Xoo* e *Xoc*. Em estágios iniciais da infecção, *Xoo* apresenta lesões umidificadas nas pontas e margens da folha e à medida que progride as lesões se tornam cloróticas (amareladas) e necróticas que se estendem da ponta da folha ao longo das nervuras. As primeiras lesões causadas por *Xoc* são pequenas e úmidas e, uma vez que a nervura foliar serve como barreira física, colonizam o tecido no sentido longitudinal da folha, formando "estrias" translúcidas e amareladas (Figura 1.1B). À medida que a infecção progride, as lesões se tornam acinzentadas levando à morte do tecido vegetal (Niño-Liu et al., 2006). Sob condições de alta umidade, ou pela manhã, lesões jovens podem gerar exsudatos, gotículas que contém grandes quantidades do patógeno (Figura 1.1C e D).

1.2 Importância agro-econômica de *X. oryzae*

O patovar *Xoo* é um patógeno de grande importância agronômica principalmente devido a sua alta agressividade no desenvolvimento da doença. Está entre os cinco primeiros fitopatógenos de maior importância mundial (Mansfield et al., 2012) e é considerada o patógeno mais importante no cultivo de arroz na Ásia, região responsável por 90% da produção mundial do grão.

Epidemias na década de 50 chegaram a provocar perdas de 30 a 40% em províncias chinesas. O desenvolvimento e o amplo uso de variedades híbridas resistentes tornaram o crestamento foliar uma ameaça endêmica e esporádica, porém não menos preocupante. Apesar do extenso controle, surtos da doença chegaram a causar perdas de aproximadamente 20% em 2005, na China (Mew et al., 2014).

A predição dos danos causados por *Xoo*, considerando as atuais condições climáticas são alarmantes num cenário sem controle da doença (Figura 1.2). E estima-se que as perdas hoje observadas se tornem mais severas e frequentes com climas extremos, escassez de água e chuvas irregulares decorrente das mudanças climáticas.

Na África, o crestamento e o estriamento foliar bacteriano respondem respectivamente por 70% e 20% da perda na produção de arroz irrigado no Oeste Africano, ameaçando a segurança alimentar desta região. São considerados doenças emergentes também no Leste da África e Madagascar (Wonni, 2016).

O Brasil é responsável por 65% da área produtora de arroz na América Latina e o 9º maior produtor mundial do grão (11.3 milhões de toneladas/ano). É o único país não-asiático dentro dos 10 maiores produtores mundiais, liderado por China, Índia e Indonésia (dados referentes ao período de 2006-2010, FAOSTAT). Em 2010, 61.1% da produção estava concentrada no Rio Grande do Sul, 9.2% em Santa Catarina, 6.1% em Mato Grosso e 5.2% em Maranhão. O aumento da produção na safra de 2003/2004 permitiu o país se tornar

autossuficiente e hoje exporta cerca de 5% da produção nacional. Além de exportar, o Brasil importa arroz principalmente do Paraguai, Uruguai e Argentina.

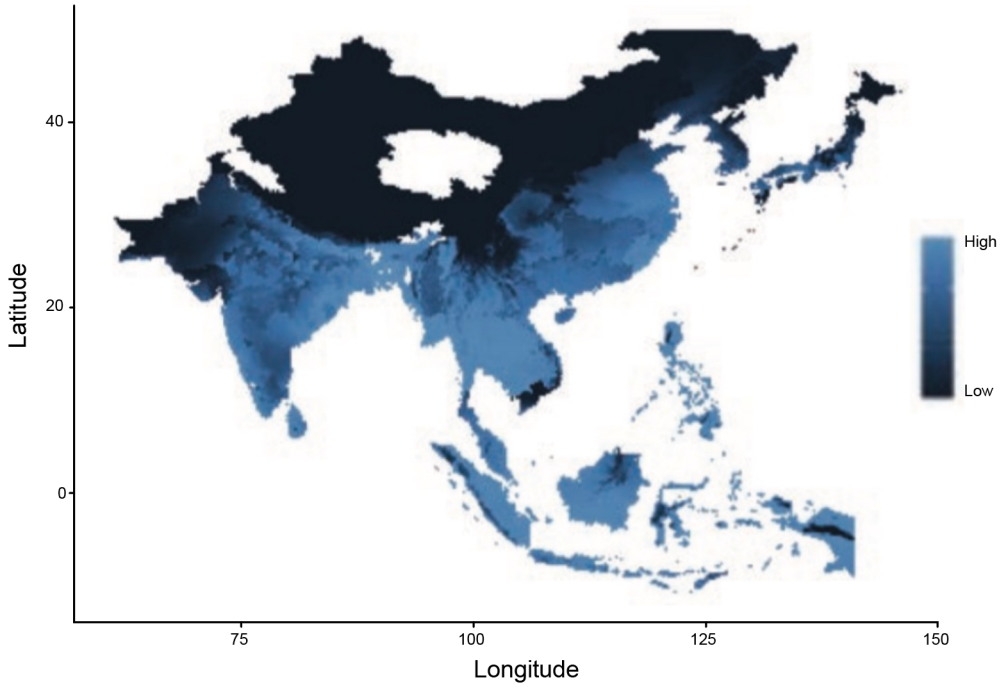

Figura 1.2 - Previsão da ocorrência e severidade (tons de azul) do crestamento foliar causados por *Xoo* na Ásia. A previsão foi calculada a partir de dados do perído de 2001 a 2010, considerando a ausência de medidas de controle da doença. O mapa foi baseado nas condições climáticas ocorridas no período de plantio determinado pelo laboratório IRRI GIS. Adaptado de Global Rice Science Partnership (GRiSP) (2013).

X. oryzae é um patógeno quarentenário A1 (definição: ausente no país, com alto risco de dano econômico) no Brasil. Por este motivo, sementes importadas pelo país passam por diagnósticos fitossanitários. Interessantemente, 21 isolados bacterianos de *Xanthomonas* sp. provenientes de sementes provindas do Uruguai e Argentina com resultados positivos para *Xoo* pelo teste de ELISA, não são identificados como *X. oryzae* por testes moleculares (Júnior et al., 2015), evidenciando a necessidade de uma melhor caracterização da diversidade e ocorrência de *X. oryzae* na América Latina.

1.3 Elementos Sequência de Inserção

Elementos Sequências de Inserção (ISs, *insertion sequences*) é um tipo de elemento de transposição, pertencente a Classe II (transposon de DNA), amplamente distribuído no domínio Bacteria. São segmentos compactos de DNA, que variam entre 0.7 a 3Kb, que codificam enzimas responsáveis pela sua própria mobilidade. A transposase pode ser organizada em uma ou duas ORFs (do inglês, *open reading frame*) – e o elemento geralmente apresenta sequências terminais invertidas (TIRs, do inglês, *terminal inverted*

repeats), essenciais para o processo de transposição (Mahillon, Chandler, 1998; Siguier et al., 2015; Varani et al., 2015) (Figura 1.3A).

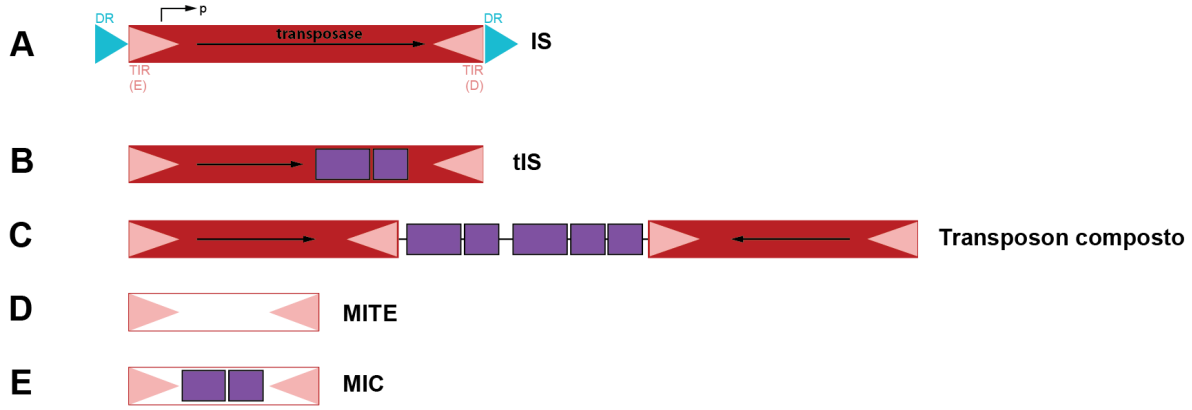

Figura 1.3 - Organização de elementos do tipo IS e elementos derivados. ISs codificam a transposase, enzima que cataliza sua mobilização (setas internas preta), geralmente apresentam repetições terminais invertidas (TIRs, setas rosa), repetições diretas (DR, setas azul-claro). Representam derivações autônomas de IS: IS transportador ou tIS (B) e transposon completo (C). Representam derivações não-autônomas: MITEs (D) e MICs (E) representam algumas derivações deste tipo de elemento de transposição. Genes passageiros (blocos roxos); *p*, região promotora da transposase; (E) esquerda; (D) direita.

O mecanismo de mobilidade é um dos principais critérios de classificação de elementos IS, e portanto, depende do tipo de transposase codificada. Atualmente, mais de 4000 ISs distintos estão classificados dentro de 25 famílias e, em sua maioria, utilizam a DDE-transposase para mobilização (Curcio, Derbyshire, 2003; Siguier et al., 2015).

DDE-transposons são assim denominados porque codificam transposases que compartilham o motivo DDE – três aminoácidos polares ácidos Asp(D), Asp(D) e Glu(E) presentes em todas as enzimas desta família. O resíduo conservado DDE, posicionado de maneira não-contígua na sequência de aminoácidos da enzima - os aminoácidos DD separados por aproximadamente 35 resíduos do aminoácido E -, é essencial para o processo de transposição uma vez que facilita a catálise pela coordenação de íons metal no sítio catalítico da transposase (Davies et al., 2000; Lovell et al., 2002).

O mecanismo de transposição de muitas famílias de IS começa com a hidrólise da cadeia fosfodiéster do DNA do sítio *doador* de transposon, que gera uma par de 3'-OH terminais (Figura 1.4). Em seguida, forma-se um complexo sináptico (transposoma) com as pontas 3'-OH terminais expostas do transposon, a enzima transposase e o sítio *alvo* da transposição , que clivam as fitas de DNA do sítio *alvo* e juntam as pontas 3'OH livres do elemento ao sítio de inserção por uma reação de trans-esterificação.

A quebra da fita do DNA *alvo* é feita através de um ataque nucleofílico pelos dois grupos 3'-OH e é geralmente deslocada em poucos nucleotídeos – geralmente de 2 a 8 nucleotídeos – e resulta na duplicação do sítio alvo de inserção ao final da transposição do

elemento (DR, do inglês *direct repeats;* Figura 1.4) (Curcio, Derbyshire, 2003; Mizuuchi, 1992).

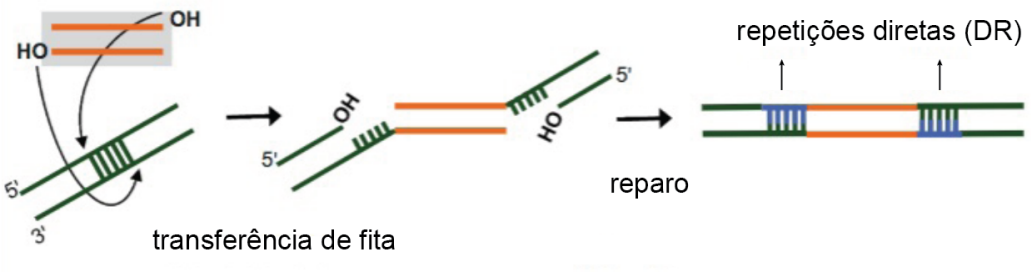

Figura 1.4 - Mecanismo de inserção de ISs em um novo sítio genômico. Catalizado epla transposase, as duas pontas de DNA com os grupos 3´-OH expostos realizam uma ataque nucleoílico ao DNA alvo. Repetições diretas (DR) são produzidas ao ser realizado o reparo do genoma após a transposição. Traduzido de Hickman, Dyda (2015).

A transposição de elementos IS pode simplesmente gerar a mudança de um elemento de um lugar a outro no genoma (transposição conservativa) ou gerar o aumento do número de cópias no genoma do organismo que reside (transposição replicativa) (Figura 1.5).

Na transposição conservativa, o elemento deve ser extraído do sítio *doador* através de quebras duplas no DNA. A principal diferença entre os mecanismos de diversas famílias de elementos é o processamento (clivagem) da segunda segunda fita de DNA para liberação completa do transposon do sítio *doador*. Ocorre um primeiro ataque nucleofílico gerando quebras de fita simples nas pontas do transposon (gerando o grupo 3'-OH, como descrito anteriormente). Um segundo subsequente evento de hidrólise pode gerar a quebra da segunda fita, como os elementos Tc1/*mariner* (Figura 1.5B).

Nos grupos IS10, IS50, Tn5 e Tn10 (família IS4), o grupo 3´-OH formado pelo primeiro evento de hidrólise atua como um nucleófilo e ataca as pontas 5´do transposon, liberando o elemento, mas resultando na formação de um *hairpin* em suas pontas (Figura 1.5A). As pontas do *hairpin* precisam ser novamente clivadas para reconstituir o grupo 3´-OH e realizar a transferência de fita ao novo sítio.

Na transposição replicativa ocorre o aumento do número de cópias e a replicação do DNA é geralmente empregada no processo. O primeiro evento de hidrólise ocorre em somente umas pontas do transposon, que por sua vez atua como nucleófilo para atacar a mesma fita de DNA, na outra extremidade do elemento (Figura 1.5D). As duas pontas do elemento são então conecatadas por uma ponte de simples fita e o mecanismo de replicação da célula hospedeira converte esta estrutura a um transposon circular. O transposon circular precisa ser novamente clivado para gerar os grupos 3´-OH e realizar a

transferência de fita. Este mecanismo é utilizado nas famílias IS3, IS30, IS110, IS256, IS21, ISL3 e IS911.

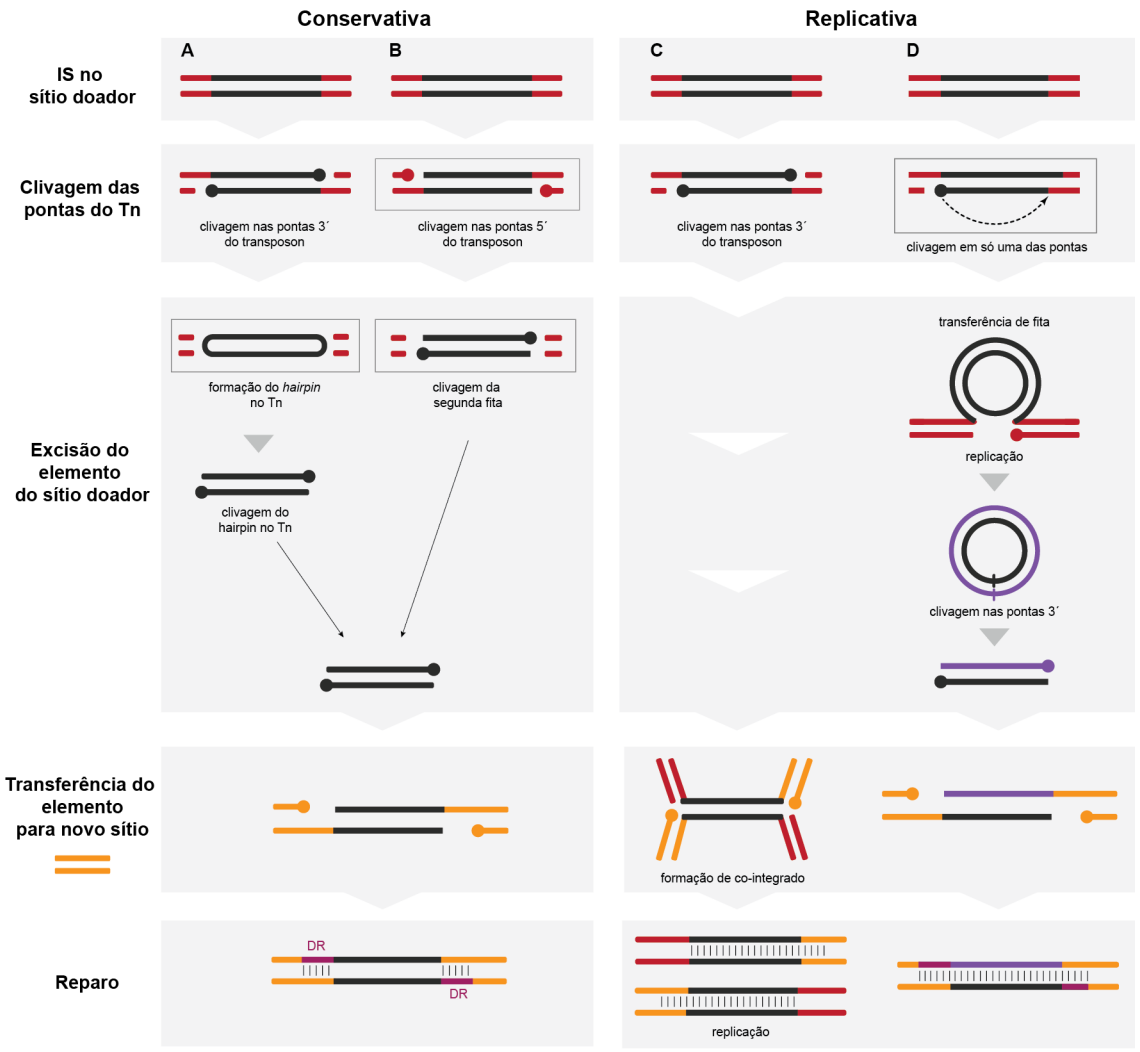

Figura 1.5 - Representação de alguns mecanismos de transposição conservativa e replicativa de transposases DDE. Na transposição conservativa é necessário a quebra de fita dupla de DNA. O processamento da segunda fita pode ocorrer pela formação de um *hairpin* nas pontas do transposon, que então é posteriormente clivado (A); alternativamente, a segunda fita pode ser processada simplesmente por um segunda reação de hidrólise, como ocorrido na clivagem da primeira fita (B). A transposição replicativa conta com o mecanismo de replicação da célula hospedeira. A transferência de fita por ser através da formação de um co-integrado entre os dois replicons involvidos (C) ou pela formação de um transposon circular. Tn, transposon; DR, repetições diretas. Adaptado de Curcio, Derbyshire (2003) e Hickman, Dyda (2015).

Comparativamente, a transposição dos elementos Mu, Tn3 e IS6 envolve dois replicons (*e.g.* um cromossomo e um plasmídeo), que representam um doador eo outro receptor do elemento. Em um processo sequencial, cada ponta clivada do transposon (com a formação do grupo 3´-OH), ataca e se une ao sítio *alvo* de inserção, resultando na fusão dos replicons envolvidos (Figura 1.5C). A replicação a partir das novas pontas 3´-OH no sítio

do DNA alvo resulta em uma molécula co-integrada, na qual os replicons doador e receptor são unidos pelas duas cópias do transposon (Curcio, Derbyshire, 2003).

Comum a todos os mecanismos, o final do processo de transposição exige o reparo de *gaps* nas fitas de DNA resultante das quebras provocadas na excisão do elemento do sítio *doador* e na integração do elemento no novo sítio. Detalhes deste processo são escassos ambos *in vivo* e *in vitro*. Assume-se que o reparo do genoma é feito por enzimas de replicação do hospedeiro ou por recombinação homóloga, quando há a presença de uma cromátide irmã (após replicação do DNA e antes da divisão celular) (Hickman,Dyda, 2015). Novos estudos apontam o auxílio de enzimas do sistema de reparo do hospedeiro, como foi demonstrado no transposon bacteriófago Mu, que utiliza a via de reparo de quebra dupla do DNA (do inglês, DSB, *double strand repair*) (Jang et al., 2012).

Existem outros tipos de elementos, semelhantes a ISs, porém com variações importantes quanto à organização. Entre eles, o IS transportador (tIS, *transporter IS*) codifica, além da transposase, genes não relacionados com sua mobilização (Figura 1.3B); transposons compostos (*composite transposons*) são formados por mais de um ISs flanqueando um conjunto de genes entre eles (Figura 1.3C). Os MITEs (discutidos no Capítulo 4, Figura 1.3D) representam unidades não autônomas de elementos, porque não codificam transposases e dependem da atividade de um outro elemento para se mobilizarem, assim como MICs (*mobile insertion cassettes*), que carregam somente gene(s) passageiro(s) por entre repetições terminais invertidas (Figura 1.3E) (Siguier et al., 2015; Varani et al., 2015).

1.4 Influência de IS na plasticidade genômica

Em uma escala de tempo evolutiva, genomas bacterianos equilibram sua natureza clonal - herança vertical do material genético pela reprodução assexuada - com mecanismos que alteram sua composição e organização.

Uma importante evidência da fluidez de genomas bacterianos é a grande variação do conteúdo gênico encontrado em espécies proximamente relacionadas, em linhagens dentro de uma mesma espécie, ou ainda, entre diferentes isolados de uma mesma população bacteriana (Cordero, Polz, 2014; Dobrindt, Hacker, 2001; Ochman et al., 2000; Polz et al., 2013; Vos et al., 2015).

A diversidade genética entre linhagens pode ser enriquecida pelo acúmulo de mutações nucleotídicas pontuais em sequências codificantes e regiões regulatórias existentes. De uma maneira mais rápida, o surgimento de novos genes pode ocorrer por duplicação gênica ou transferência lateral. Enquanto a diversificação do conteúdo gênico por duplicação gênica é observada com maior frequência em eucariotos, transferência horizontal

é considerado o principal meio de aquisição de novos genes em Bacteria (Gogarten, Townsend, 2005). Rearranjo cromossômico também é considerado um processo de aumento de variabilidade, uma vez que reorganiza o conteúdo gênico e estabelece novas associações regulatórias do mesmo conjunto gênico. Eventos de recombinação e perda gênica contrabalançam as tendências de expansão e divergência genética (Dobrindt, Hacker, 2001).

Elementos IS compõem uma fração importante de elementos repetitivos de genomas bacterianos (Treangen et al., 2009) e são mediadores de processos que introduzem variação genômica no grupo Bactéria.

A natureza de elementos móveis, que incluem os elementos IS, é traduzida em oportunidades e desafios nos genomas que os contém. Por promoverem sua própria mobilidade, são capazes de se propagar pelo genoma indiscriminadamente. Isto se torna particularmente desafiador no compacto genoma bacteriano, cujas sequências codificantes (de proteínas ou moléculas de RNA centrais ao funcionamento) totalizam 85-90% do genomas. Ainda, parte do restante corresponde a regiões regulatórias. Assim, a fração genômica que está de fato livre de pressões seletivas é limitada e a transposição inerentemente tem uma alta probabilidade de interromper genes importantes à célula ou interferir em regiões controladoras de genes.

A mesma capacidade disruptiva de elementos de transposição pode ser interpretada como oportunidade de geração de heterogeneidade genética, trazendo novos substratos para evolução, que abrange a aquisição de capacidade de colonização e adaptação a novos nichos.

Por codificarem elementos regulatórios, ISs influenciam localmente genomas de seus hospedeiro bacterianos alterando a expressão de genes adjacentes ao local de inserção, por silenciamento ou amplificação da transcrição (Bohn, Bouloc, 1998; Darmon, Leach, 2014; Gregory, Dahlberg, 2008; Reynolds et al., 1981; Saedler et al., 1974; SaiSree et al., 2001; Zhang, Saier, 2009).

A presença de múltiplas cópias de elementos de repetição aumenta a probabilidade de eventos de rearranjo. Assim, ISs podem promover rearranjos intragenômicos de grande magnitude como deleções, inversões ou duplicações genômicas, utilizando a maquinaria celular nativa de recombinação. Ainda, elementos IS podem ser permutados entre diferentes genomas por mecanismos de transferência lateral de genes (Chain et al., 2004; Parkhill et al., 2003).

Esta tese de Doutorado investiga a influência de elementos móveis em linhagens de *X. oryzae*. O estudo comparativo de espécies filogeneticamente próximas ainda que patogenicamente distintas, como *Xoo* e *Xoc*, tem como objetivo revelar complexidades na

evolução de patógenos e o papel de interações sutis entre patógeno e hospedeiro. Os dois patovares de *X. oryzae* apresentam um conjunto de características que os colocam como modelo para o estudo proposto: são filogeneticamente muito próximas; fenotipicamente, apresentam o mesmo organismo hospedeiro porém possuem modo de infecção marcadamente distinto, que determina sua agressividade e; genotipicamente, possuem perfis de distribuição de elementos IS significativamente distintos entre si e comparado às outras espécies presentes no grupo *Xanthomonas* (abordado com mais detalhe no Capítulo 3).

Abordamos a influência de elementos móveis em *X. oryzae* nos três próximos capítulos desta tese. O Capítulo 2 se refere a um evento de transferência horizontal da ilha genômica denominada XODB602, encontrada em *Xoc* porém ausente em *Xoo*. Avaliamos o caráter adaptativo da aquisição da ilha genômica por *Xoc* através de uma investigação biogeográfica, em populações de *Xoc* de diferentes regiões geográficas.

No Capítulo 3 mostramos que a espécie *X. oryzae* amplificou o número de elementos IS em seus genomas, comparado a outras espécies de *Xanthomonas*. Mostramos que genes pertencentes ao sistema de reparo de DNA podem estar sob influência de elementos e avaliamos *in silico* o possível envolvimento do sistema nativo de reparo na proliferação genômica de transposons do tipo IS em *X. oryzae*.

E finalmente o Capítulo 4, descrevemos um novo elemento do tipo MITE, atualmente restrito à espécie *X. oryzae*. Além de sua organização, descrevemos a frequência deste elemento nos genomas disponíveis de *X. oryzae*, apresentamos evidências de sua expressão celular e avaliamos uma possível funcionalidade no processo de interação entre *X. oryzae* e seus hospedeiro *O. sativa*.

1.5 Objetivo

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o impacto de elementos genéticos móveis presentes nas linhagens de *Xanthomonas oryzae* e inclui *1)* identificar o contexto evolutivo da ilha genômica XODB602 presente em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, seu papel na inovação evolutiva do genoma e na garantia do sucesso evolutivo do organismo hospedeiro e *2)* identificar o envolvimento do sistema de reparo na proliferação de elementos de inserção nas linhagens de *X. oryzae*.

SEÇÃO 1 - REFERÊNCIAS

Arber W. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. FEMS Microbiol Rev. 2000;24(1):1–7.

Cordero OX, Polz MF. Explaining microbial genomic diversity in light of evolutionary ecology. Nat Rev Microbiol. 2014;12(4):263–73.

Chain PSG, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, et al. Insights into the evolution of Yersinia pestis through whole-genome comparison with Yersinia pseudotuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(38):13826–31.

Curcio MJ, Derbyshire KM. The outs and ins of transposition: from Mu to Kangaroo. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4(11):865–77.

Davies DR, Goryshin IY, Reznikoff WS, Rayment I. Three-Dimensional Structure of the Tn5 Synaptic Complex Transposition Intermediate. Science. 2000;289(5476):77–85.

Dobrindt U, Hacker J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. Curr Opin Microbiol. 2001;4(5):550–7.

Global Rice Science Partnership (GRiSP). Rice Almanac. 4th Edition. International Rice Research Institute; 2013.

Gogarten JP, Townsend JP. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. Nat Rev Microbiol. 2005;3(9):679–87.

Hickman AB, Dyda F. Mechanisms of DNA Transposition. Microbiol Spectr [Internet]. 2015;3(2):e1-22

Jang S, Sandler SJ, Harshey RM. Mu Insertions Are Repaired by the Double-Strand Break Repair Pathway of Escherichia coli. PLOS Genet. 2012;8(4):e1002642.

Júnior S, De IT, Santos M de O, Oliveira AMR de, Moraes MG de, Duarte V, et al., Isolates characterization of Xanthomonas sp. Associated with rice seed and differentiation of Xanthomonas oryzae strains. Ciênc Rural. 2015;45(12):2099–105.

Lovell S, Goryshin IY, Reznikoff WR, Rayment I. Two-metal active site binding of a Tn5 transposase synaptic complex. Nat Struct Mol Biol. 2002 Apr;9(4):278–81.

Lu H, Patil P, Sluys M-AV, White FF, Ryan RP, Dow JM, et al., Acquisition and Evolution of Plant Pathogenesis–Associated Gene Clusters and Candidate Determinants of Tissue-Specificity in Xanthomonas. PLOS ONE. 2008;3(11):e3828.

Mahillon J, Chandler M. Insertion Sequences. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(3):725–74.
Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, et al., Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. Mol Plant Pathol. 2012;13(6):614–29.

Mew TW, Hibino H, Savary S, Vera Cruz CM. Rice diseases: their biology and selected management practices [Internet]. International Rice Research Institute (IRRI), Africa Rice Center (AfricaRice), and the International Center for Tropical Agriculture (CIAT); 2014.

Mizuuchi K. Transpositional Recombination: Mechanistic Insights from Studies of Mu and Other Elements. Annu Rev Biochem. 1992;61(1):1011–51.

Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ. Xanthomonas oryzae pathovars: model pathogens of a model crop. Mol Plant Pathol. 2006;7(5):303–24.

Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature. 2000;405(6784):299–304.

Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al. Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. Nat Genet. 2003;35(1):32–40.

Polz MF, Alm EJ, Hanage WP. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. Trends Genet. 2013;29(3):170–5.

Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, et al., Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium–plant interactions. Nat Rev Microbiol. 2011;9(5):344–55.

Siguier P, Gourbeyre E, Varani A, Ton-Hoang B, Chandler M. Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. Microbiol Spectr. 2015;3(2):e1-35

Treangen TJ, Abraham A-L, Touchon M, Rocha EPC. Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(3):539–71.

Varani A, Carvalho L, Zerillo MM, Monteiro-Vitorello CB. Elementos de Transposição: Classifição e Mecanismos de Mobilização. In: Elementos de Transposição Diversidade, evolução aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos. FIOCRUZ; 2015. p. 11–43.

Vos M, Hesselman MC, te Beek TA, van Passel MWJ, Eyre-Walker A. Rates of Lateral Gene Transfer in Prokaryotes: High but Why? Trends Microbiol. 2015;23(10):598–605.

Wonni I. Evaluation of Elite Rice Varieties Unmasks New Sources of Bacterial Blight and Leaf Streak Resistance for Africa. Rice Res Open Access. 2016; 4(1):e1-8

SEÇÃO 2 - REFERÊNCIAS

Brown JR. Ancient horizontal gene transfer. Nat Rev Genet. 2003;4(2):121–32.

Davis JJ, Olsen GJ. Characterizing the Native Codon Usages of a Genome: An Axis Projection Approach. Mol Biol Evol. 2011;28(1):211–21.

De Vleesschauwer D, Gheysen G, Höfte M. Hormone defense networking in rice: tales from a different world. Trends Plant Sci. 2013;18(10):555–65.

Dhillon BK, Laird MR, Shay JA, Winsor GL, Lo R, Nizam F, et al., IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. Nucleic Acids Res. 2015;43(W1):W104–8.

Grantham R, Gautier C, Gouy M, Mercier R, Pavé A. Codon catalog usage and the genome hypothesis. Nucleic Acids Res. 1980;8(1):r49–62.

Hayashi S, Gresshoff PM, Ferguson BJ. Mechanistic action of gibberellins in legume nodulation. J Integr Plant Biol. 2014;56(10):971–8.

Hedden P, Thomas SG. Gibberellin biosynthesis and its regulation. Biochem J. 2012;444(1):11–25.

Hershey DM, Lu X, Zi J, Peters RJ. Functional Conservation of the Capacity for ent-Kaurene Biosynthesis and an Associated Operon in Certain Rhizobia. J Bacteriol. 2014;196(1):100–6.

Lawrence JG, Ochman H. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. J Mol Evol. 1997;44(4):383–97.

Lima WC, Sluys M-AV, Menck CFM. Non-Gamma-Proteobacteria Gene Islands Contribute to the Xanthomonas Genome. OMICS J Integr Biol. 2005;9(2):160–72.

Liu H, Chang Q, Feng W, Zhang B, Wu T, Li N, et al., Domain Dissection of AvrRxo1 for Suppressor, Avirulence and Cytotoxicity Functions. PLOS ONE. 2014 Dec 1;9(12):e113875.

Lu X, Hershey DM, Wang L, Bogdanove AJ, Peters RJ. An ent-kaurene-derived diterpenoid virulence factor from Xanthomonas oryzae pv. oryzicola. New Phytol. 2015;206(1):295–302.

Méndez C, Baginsky C, Hedden P, Gong F, Carú M, Rojas MC. Gibberellin oxidase activities in Bradyrhizobium japonicum bacteroids. Phytochemistry. 2014;98:101–9.

Morrone D, Chambers J, Lowry L, Kim G, Anterola A, Bender K, et al., Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in Bradyrhizobium japonicum. FEBS Lett. 2009;583(2):475–80.

Nett RS, Montanares M, Marcassa A, Lu X, Nagel R, Charles TC, et al. Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. Nat Chem Biol. 2016; advance online publication.

Puigbò P, Bravo IG, Garcia-Vallve S. CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation. Biol Direct. 2008;3:38.

Qin X, Liu JH, Zhao WS, Chen XJ, Guo ZJ, Peng YL. Gibberellin 20-Oxidase Gene OsGA20ox3 Regulates Plant Stature and Disease Development in Rice. Mol Plant Microbe Interact. 2012;26(2):227–39.

Raymundo AK, Briones AM, Ardales EY, Perez MT, Fernandez LC, Leach JE, et al., Analysis of DNA Polymorphism and Virulence in Philippine Strains of Xanthomonas oryzae pv. oryzicola. Plant Dis. 1999;83(5):434–40.

Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JDG. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just Jasmonate-Salicylate Antagonism. Annu Rev Phytopathol. 2011;49(1):317–43.

Tatsukami Y, Ueda M. Rhizobial gibberellin negatively regulates host nodule number. Sci Rep. 2016;6: 27998.

Triplett LR, Shidore T, Long J, Miao J, Wu S, Han Q, et al., AvrRxo1 Is a Bifunctional Type III Secreted Effector and Toxin-Antitoxin System Component with Homologs in Diverse Environmental Contexts. PLOS ONE. 2016;11(7):e0158856.

Vleesschauwer DD, Seifi HS, Filipe O, Haeck A, Huu SN, Demeestere K, et al., The DELLA Protein SLR1 Integrates and Amplifies Salicylic Acid- and Jasmonic Acid-Dependent Innate Immunity in Rice. Plant Physiol. 2016;170(3):1831–47.

Wilkins KE, Booher NJ, Wang L, Bogdanove AJ. TAL effectors and activation of predicted host targets distinguish Asian from African strains of the rice pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzicola while strict conservation suggests universal importance of five TAL effectors. Plant Biot Interact. 2015;536.

Wonni I, Cottyn B, Detemmerman L, Dao S, Ouedraogo L, Sarra S, et al. Analysis of Xanthomonas oryzae pv. oryzicola Population in Mali and Burkina Faso Reveals a High Level of Genetic and Pathogenic Diversity. Phytopathology. 2013;104(5):520–31.

Yang D-L, Li Q, Deng Y-W, Lou Y-G, Wang M-Y, Zhou G-X, et al., Altered Disease Development in the eui Mutants and Eui Overexpressors Indicates that Gibberellins Negatively Regulate Rice Basal Disease Resistance. Mol Plant. 2008;1(3):528–37.

Zhao B, Ardales EY, Raymundo A, Bai J, Trick HN, Leach JE, et al., The avrRxo1 Gene from the Rice Pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzicola Confers a Nonhost Defense Reaction on Maize with Resistance Gene Rxo1. Mol Plant Microbe Interact. 2004;17(7):771–9.

SEÇÃO 3 - REFERÊNCIAS

Ball CA, Johnson RC. Efficient excision of phage lambda from the Escherichia coli chromosome requires the Fis protein. J Bacteriol. 1991;173(13):4027–31.

Bloom LB. Loading Clamps for DNA Replication and Repair. DNA Repair. 2009;8(5):570–8.

Cahoon LA, Stohl EA, Seifert HS. The Neisseria gonorrhoeae photolyase orthologue phrB is required for proper DNA supercoiling but does not function in photo-reactivation. Mol Microbiol. 2011;79(3):729–42.

Chain PSG, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, et al., Insights into the evolution of Yersinia pestis through whole-genome comparison with Yersinia pseudotuberculosis. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(38):13826–31.

Chong S, Chen C, Ge H, Xie XS. Mechanism of Transcriptional Bursting in Bacteria. Cell. 2014;158(2):314–26.

Darmon E, Leach DRF. Bacterial Genome Instability. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;78(1):1–39.

Denamur E, Matic I. Evolution of mutation rates in bacteria. Mol Microbiol. 2006;60(4):820–7.

Díaz-Maldonado H, Gómez MJ, Moreno-Paz M, Martín-Úriz PS, Amils R, Parro V, et al., Transposase interaction with the β sliding clamp: effects on insertion sequence proliferation and transposition rate. Sci Rep. 2015;5:13329.

Dorman CJ, Colgan A, Dorman MJ. Bacterial pathogen gene regulation: a DNA-structure-centred view of a protein-dominated domain. Clin Sci. 2016;130(14):1165–77.

Eichenbaum Z, Livneh Z. UV Light Induces IS10 Transposition in Escherichia coli. Genetics. 1998;149(3):1173–81.

Fernández A, Gil E, Cartelle M, Pérez A, Beceiro A, Mallo S, et al., Interspecies spread of CTX-M-32 extended-spectrum β-lactamase and the role of the insertion sequence IS1 in down-regulating blaCTX-M gene expression. J Antimicrob Chemother. 2007;59(5):841–7.

Finkel SE, Johnson RC. The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore. Mol Microbiol. 1992;6(22):3257–65.

Giraud A, Matic I, Tenaillon O, Clara A, Radman M, Fons M, et al. Costs and Benefits of High Mutation Rates: Adaptive Evolution of Bacteria in the Mouse Gut. Science. 2001;291(5513):2606–8.

Gonzalez C, Szurek B, Manceau C, Mathieu T, Séré Y, Verdier V. Molecular and Pathotypic Characterization of New Xanthomonas oryzae Strains from West Africa. Mol Plant Microbe Interact. 2007;20(5):534–46.

Huguet-Tapia JC, Peng Z, Yang B, Yin Z, Liu S, White FF. Complete Genome Sequence of the African Strain AXO1947 of Xanthomonas oryzae pv. oryzae. Genome Announc. 2016;4(1).

Kuan CT, Liu SK, Tessman I. Excision and transposition of Tn5 as an SOS activity in Escherichia coli. Genetics. 1991;128(1):45–57.

Lavatine L, He S, Caumont-Sarcos A, Guynet C, Marty B, Chandler M, et al., Single strand transposition at the host replication fork. Nucleic Acids Res. 2016;gkw661.

Li G-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. Cell Res. 2008;18(1):85–98.

Li G-M. Novel molecular insights into the mechanism of GO removal by MutM. Cell Res. 2010;20(2):116–8.

Luque I, Andújar A, Jia L, Zabulon G, De Marsac NT, Flores E, et al., Regulated expression of glutamyl-tRNA synthetase is directed by a mobile genetic element in the cyanobacterium Tolypothrix sp. PCC 7601. Mol Microbiol. 2006;60(5):1276–88.

Martins-Pinheiro M, Galhardo RS, Lage C, Lima-Bessa KM, Aires KA, Menck CF. Different patterns of evolution for duplicated DNA repair genes in bacteria of the Xanthomonadales group. BMC Evol Biol. 2004;4:29.

Mathew R, Chatterji D. The evolving story of the omega subunit of bacterial RNA polymerase. Trends Microbiol. 2006;14(10):450–5.

McDonald BA, Linde and C. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. Annu Rev Phytopathol. 2002;40(1):349–79.

Monteiro-Vitorello CB, De Oliveira MC, Zerillo MM, Varani AM, Civerolo E, Sluys M-AV. Xylella and Xanthomonas Mobil'omics. OMICS J Integr Biol. 2005;9(2):146–59.

Moran NA, Wernegreen JJ. Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. Trends Ecol Evol. 2000;15(8):321–6.

Nagy Z, Chandler M. Regulation of transposition in bacteria. Res Microbiol. 2004;155(5):387–98.

O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. Planta. 2012;236(3):765–79.

Oliver A, Baquero F, Blázquez J. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in Pseudomonas aeruginosa: molecular characterization of naturally occurring mutants. Mol Microbiol. 2002;43(6):1641–50.

Onda M, Hanada K, Kawachi H, Ikeda H. Escherichia coli MutM Suppresses Illegitimate Recombination Induced by Oxidative Stress. Genetics. 1999;151(2):439–46.

Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, et al., Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. Nat Genet. 2003;35(1):32–40.

Pasternak C, Ton-Hoang B, Coste G, Bailone A, Chandler M, Sommer S. Irradiation-Induced Deinococcus radiodurans Genome Fragmentation Triggers Transposition of a Single Resident Insertion Sequence. PLOS Genet. 2010;6(1):e1000799.

Philippe N, Crozat E, Lenski RE, Schneider D. Evolution of global regulatory networks during a long-term experiment with Escherichia coli. BioEssays. 2007;29(9):846–60.

Pieretti I, Royer M, Barbe V, Carrere S, Koebnik R, Cociancich S, et al., The complete genome sequence of Xanthomonas albilineans provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. BMC Genomics. 2009;10:616.

Pohlhaus JR, Long DT, O'Reilly E, Kreuzer KN. The ε Subunit of DNA Polymerase III Is Involved in the Nalidixic Acid-Induced SOS Response in Escherichia coli. J Bacteriol. 2008;190(15):5239–47.

Ryan RP, Vorhölter F-J, Potnis N, Jones JB, Van Sluys M-A, Bogdanove AJ, et al., Pathogenomics of Xanthomonas: understanding bacterium–plant interactions. Nat Rev Microbiol. 2011;9(5):344–55.
Selle K, Barrangou R. Harnessing CRISPR–Cas systems for bacterial genome editing. Trends Microbiol. 2015;23(4):225–32.

Shi Q, Parks AR, Potter BD, Safir IJ, Luo Y, Forster BM, et al., DNA Damage Differentially Activates Regional Chromosomal Loci for Tn7 Transposition in Escherichia coli. Genetics. 2008;179(3):1237–50.

Siguier P, Filée J, Chandler M. Insertion sequences in prokaryotic genomes. Curr Opin Microbiol. 2006a;9(5):526–31.

Siguier P, Gourbeyre E, Varani A, Ton-Hoang B, Chandler M. Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. Microbiol Spectr. 2015;3(2).

Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. Nucleic Acids Res. 2006b;34:D32–6.

Singh J, Mukerji M, Mahadevan S. Transcriptional activation of the Escherichia coli bgl operon: negative regulation by DNA structural elements near the promoter. Mol Microbiol. 1995;17(6):1085–92.

Soto-Suárez M, González C, Piégu B, Tohme J, Verdier V. Genomic comparison between Xanthomonas oryzae pv. oryzae and Xanthomonas oryzae pv. oryzicola, using suppression-subtractive hybridization. FEMS Microbiol Lett. 2010;308(1):16–23.

Torres MA, Jones JDG, Dangl JL. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. Plant Physiol. 2006;141(2):373–8.

Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al., The role of ISAba1 in expression of OXA carbapenemase genes in Acinetobacter baumannii. FEMS Microbiol Lett. 2006;258(1):72–7.

Varani A, Carvalho L, Zerillo MM, Monteiro-Vitorello CB. Elementos de Transposição: Classifição e Mecanismos de Mobilização. In: Elementos de Transposição Diversidade, evolução aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos. FIOCRUZ; 2015. p. 11–43.

Varani AM, Siguier P, Gourbeyre E, Charneau V, Chandler M. ISsaga is an ensemble of web-based methods for high throughput identification and semi-automatic annotation of insertion sequences in prokaryotic genomes. Genome Biol. 2011;12:R30.

Vital M, Chai B, Østman B, Cole J, Konstantinidis KT, Tiedje JM. Gene expression analysis of E. coli strains provides insights into the role of gene regulation in diversification. ISME J. 2015;9(5):1130–40.

Wilkins KE, Booher NJ, Wang L, Bogdanove AJ. TAL effectors and activation of predicted host targets distinguish Asian from African strains of the rice pathogen Xanthomonas oryzae pv. oryzicola while strict conservation suggests universal importance of five TAL effectors. Plant Biot Interact. 2015;536.

Wonni I. Evaluation of Elite Rice Varieties Unmasks New Sources of Bacterial Blight and Leaf Streak Resistance for Africa. J Rice Res. 2016 22;4(1):8.

Wyatt MD, Allan JM, Lau AY, Ellenberger TE, Samson LD. 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol. 1999;21(8):668–76.

Zhang Z, Saier MH. A Novel Mechanism of Transposon-Mediated Gene Activation. PLOS Genet. 2009;5(10):e1000689.

SEÇÃO 4 - REFERÊNCIAS

Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. Nat Biotechnol. 2016;34(5):525–7.

Chaloner T, van Kan JAL, Grant-Downton RT. RNA “Information Warfare” in Pathogenic and Mutualistic Interactions. Trends Plant Sci. 2016;21(9):738–48.

Chong YT, Gidda SK, Sanford C, Parkinson J, Mullen RT, Goring DR. Characterization of the Arabidopsis thaliana exocyst complex gene families by phylogenetic, expression profiling, and subcellular localization studies. New Phytol. 2010;185(2):401–19.

Chou C-C, Chen C-H, Lee T-T, Peck K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. Nucleic Acids Res. 2004;32(12):e99–e99.

Collinge DB. Cell wall appositions: the first line of defence. J Exp Bot. 2009;60(2):351–2.

Crooks GE, Hon G, Chandonia J-M, Brenner SE. WebLogo: A Sequence Logo Generator. Genome Res. 2004;14(6):1188–90.

Darmon E, Leach DRF. Bacterial Genome Instability. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;78(1):1–39.

Delihas N. Impact of Small Repeat Sequences on Bacterial Genome Evolution. Genome Biol Evol. 2011;3:959–73.

Fattash I, Lee C-N, Mo K, Yang G. Efficient transposition of the youngest miniature inverted repeat transposable element family of yellow fever mosquito in yeast. FEBS J. 2015;282(10):1829–40.

Geering ADW, Maumus F, Copetti D, Choisne N, Zwickl DJ, Zytnicki M, et al., Endogenous florendoviruses are major components of plant genomes and hallmarks of virus evolution. Nat Commun. 2014;5:5269.

Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat Rev Genet. 2016;17(6):333–51.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. Mol Biol Evol. 2010;27(2):221–4.

Han M-J, Shen Y-H, Gao Y-H, Chen L-Y, Xiang Z-H, Zhang Z. Burst expansion, distribution and diversification of MITEs in the silkworm genome. BMC Genomics. 2010;11:520.

Hikosaka A, Nishimura K, Hikosaka-Katayama T, Kawahara A. Recent transposition activity of Xenopus T2 family miniature inverted-repeat transposable elements. Mol Genet Genomics MGG. 2011 Mar;285(3):219–24.

Huang J, Zhao X, Yu H, Ouyang Y, Wang L, Zhang Q. The ankyrin repeat gene family in rice: genome-wide identification, classification and expression profiling. Plant Mol Biol. 2009;71(3):207–26.

Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, et al., Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. Nat Biotechnol. 2001;19(4):342–7.

Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(1):22–32.

Jacob F, Vernaldi S, Maekawa T. Evolution and Conservation of Plant NLR Functions. Front Immunol. 2013;4.

Jiang N, Feschotte C, Zhang X, Wessler SR. Using rice to understand the origin and amplification of miniature inverted repeat transposable elements (MITEs). Curr Opin Plant Biol. 2004;7(2):115–9.

Joshua-Tor L. The Argonautes. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2006;71:67–72.

Journot-Catalino N, Somssich IE, Roby D, Kroj T. The Transcription Factors WRKY11 and WRKY17 Act as Negative Regulators of Basal Resistance in Arabidopsis thaliana. Plant Cell. 2006;18(11):3289–302.

Kapoor M, Arora R, Lama T, Nijhawan A, Khurana JP, Tyagi AK, et al., Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. BMC Genomics. 2008;9:451.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Res. 2002;30(14):3059–66.

Knip M, Constantin ME, Thordal-Christensen H. Trans-kingdom Cross-Talk: Small RNAs on the Move. PLOS Genet. 2014;10(9):e1004602.

Lacroix B, Citovsky V. A mutation in negative regulator of basal resistance WRKY17 of Arabidopsis increases susceptibility to Agrobacterium-mediated genetic transformation. F1000Research. 2013;2.

Liu Y, Cui Y, Mukherjee A, Chatterjee AK. Characterization of a novel RNA regulator of Erwinia carotovora ssp. carotovora that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. Mol Microbiol. 1998;29(1):219–34.

Lorenz R, Bernhart SH, Höner zu Siederdissen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, et al., ViennaRNA Package 2.0. Algorithms Mol Biol. 2011;6:26.

Lu C, Chen J, Zhang Y, Hu Q, Su W, Kuang H. Miniature Inverted–Repeat Transposable Elements (MITEs) Have Been Accumulated through Amplification Bursts and Play Important Roles in Gene Expression and Species Diversity in Oryza sativa. Mol Biol Evol. 2012;29(3):1005–17.

Luchetti A. terMITEs: miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in the termite genome (Blattodea: Termitoidae). Mol Genet Genomics. 2015;290(4):1499–509.

Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. Mol Biol Evol. 2015;32(1):268–74.

Nishimura A, Ito M, Kamiya N, Sato Y, Matsuoka M. OsPNH1 regulates leaf development and maintenance of the shoot apical meristem in rice. Plant J. 2002;30(2):189–201.

Nouroz F, Noreen S, Heslop-Harrison JS. Evolutionary genomics of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in Brassica. Mol Genet Genomics. 2015;290(6):2297–312.

Oki N, Yano K, Okumoto Y, Tsukiyama T, Teraishi M, Tanisaka T. A genome-wide view of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in rice, Oryza sativa ssp. japonica. Genes Genet Syst. 2008;83(4):321–9.

Paolo DD, Afanzar O, Armitage JP, Berry RM. Single-molecule imaging of electroporated dye-labelled CheY in live Escherichia coli. Phil Trans R Soc B. 2016;371(1707):20150492.

Pečenková T, Hála M, Kulich I, Kocourková D, Drdová E, Fendrych M, et al., The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant–pathogen interaction. J Exp Bot. 2011;62(6): 2107-2116.

Piriyapongsa J, Jordan IK. Dual coding of siRNAs and miRNAs by plant transposable elements. RNA. 2008;14(5):814–21.

Qi D, Innes RW. Recent Advances in Plant NLR Structure, Function, Localization, and Signaling. Front Immunol. 2013;4.

Quibod IL, Perez-Quintero A, Booher NJ, Dossa GS, Grande G, Szurek B, et al., Effector Diversification Contributes to Xanthomonas oryzae pv. oryzae Phenotypic Adaptation in a Semi-Isolated Environment. Sci Rep. 2016;6:34137.

Schmidtke C, Abendroth U, Brock J, Serrania J, Becker A, Bonas U. Small RNA sX13: A Multifaceted Regulator of Virulence in the Plant Pathogen Xanthomonas. PLOS Pathog. 2013;9(9):e1003626.

Seo Y-S, Sriariyanun M, Wang L, Pfeiff J, Phetsom J, Lin Y, et al., A two-genome microarray for the rice pathogens Xanthomonas oryzae pv. oryzae and X. oryzae pv. oryzicola and its use in the discovery of a difference in their regulation of hrp genes. BMC Microbiol. 2008;8:99.

Siddique A, Buisine N, Chalmers R. The Transposon-Like Correia Elements Encode Numerous Strong Promoters and Provide a Potential New Mechanism for Phase Variation in the Meningococcus. PLOS Genet. 2011;7(1):e1001277.

Teixeira MA, Wei L, Kaloshian I. Root-knot nematodes induce pattern-triggered immunity in Arabidopsis thaliana roots. New Phytol. 2016;211(1):276–87.

The 3,000 rice genomes project. The 3,000 rice genomes project. GigaScience. 2014;3(1):7.

Tsuge S, Furutani A, Fukunaka R, Oku T, Tsuno K, Ochiai H, et al., Expression of Xanthomonas oryzae pv. oryzae hrp Genes in XOM2, a Novel Synthetic Medium. J Gen Plant Pathol. 2002;68(4):363–71.

Underwood W. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. Plant Physiol. 2012;3:85.

Vaschetto LM. Miniature Inverted-repeat Transposable Elements (MITEs) and their effects on the regulation of major genes in cereal grass genomes. Mol Breed. 2016;36(3):30.

Weiberg A, Wang M, Bellinger M, Jin H. Small RNAs: A New Paradigm in Plant-Microbe Interactions. Annu Rev Phytopathol. 2014;52(1):495–516.

Weiberg A, Wang M, Lin F-M, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, et al., Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. Science. 2013;342(6154):118–23.

Yaakov B, Ben-David S, Kashkush K. Genome-Wide Analysis of Stowaway-Like MITEs in Wheat Reveals High Sequence Conservation, Gene Association, and Genomic Diversification. Plant Physiol. 2013;161(1):486–96.

Yuan X, Zhang S, Qing X, Sun M, Liu S, Su H, et al., Superfamily of ankyrin repeat proteins in tomato. Gene. 2013;523(2):126–36.

Zeng Q, McNally RR, Sundin GW. Global Small RNA Chaperone Hfq and Regulatory Small RNAs Are Important Virulence Regulators in Erwinia amylovora. J Bacteriol. 2013 Apr 15;195(8):1706–17.

Zhang F, Du Z, Huang L, Cruz CV, Zhou Y, Li Z. Comparative Transcriptome Profiling Reveals Different Expression Patterns in Xanthomonas oryzae pv. oryzae Strains with Putative Virulence-Relevant Genes. PLOS ONE. 2013;8(5):e64267.

Zhang Y, Jiang W, Gao L. Evolution of MicroRNA Genes in Oryza sativa and Arabidopsis thaliana: An Update of the Inverted Duplication Model. PLoS ONE;6(12).

5 CONCLUSÃO

Investigamos a influência de elementos genéticos móveis em linhagens de *X. oryzae* sob três diferentes aspectos nesta tese. Primeiramente, investigamos um evento particular de transferência horizontal adquirido exclusivamente pelo patovar *Xoc*, porém ausente em *Xoo* e linhagens filogenéticamente próximas (Capítulo 2). A presença de elementos IS na vizinhança do *operon* de biossíntese de giberelina A_4 denota mobilidade desta característica singular à *Xoc*. A importância da produção do fitormônio GA_4 em *Xoc* é indicada pela alta prevalência do *operon* em diferentes populações, *i.e.* isolados coletados de plantas com sintomas de estriamento foliar bacteriano (BLS) de ampla distribuição geográfica e por intervalo de tempo de mais de quatro décadas.

De uma maneira mais ampla, analisamos o impacto potencial de elementos de transposição inseridos na vizinhança de genes do sistema fundamental do metabolismo bacteriano, o sistema de reparo de DNA (Capítulo 3). Diferentes cepas de *Xoo* e *Xoc* apresentam quantidades e perfis de elementos de transposição, representados por elementos do tipo IS, bastante distintos. Como esperado, observamos que o aumento do número de elementos, como identificado em *Xoo*, resulta no aumento no número de genes potencialmente influenciados pelos elementos. No entanto, a comparação entre cepas do mesmo patovar *Xoo*, mostrou que a influência de elementos é multifacetada: detectamos eventos de proximidade compartilhados por um patovar, eventos compartilhados entre populações de certa região geográfica, e ainda, eventos que são exclusivos à uma cepa, neste momento desprovidos de padrão.

Por fim, descrevemos um novo elemento encontrado em *X. oryzae* e analisamos sua organização, distribuição, filogenia, assim como sua atividade transcricional em *X. oryzae* e o potencial funcional na interação com seu hospedeiro (Capítulo 4).

Assim, esta tese elabora um arcabouço de múltiplas linhas de investigação e provê fundamentação para diversas avalições experimentais futuras. A aquisição do *operon* de síntese de GA_4 é relevante e prevalente em *Xoc*, porém é necessário entender de forma mais precisa qual etapa molecular do processo de colonização por *Xoc* está sendo influenciado por esse hormônio. Ainda, considerando que pequenos incrementos em *fitness* observados experimentalmente representam grandes consequências em escala evolutiva, avaliar o impacto em *fitness* desta característica é fundamental para provar sua função adaptativa em *Xoc*. Uma pergunta intrigante que permanece neste tema é: por quê o patovar *Xoo* não adquiriu este operon, uma vez que pode ocorrer fluxo gênico entre esses dois patovares que co-habitam o mesmo hospedeiro e coexistem em escala biogeográfica?

A amplificação dos elementos IS na espécie *X. oryzae* não se associa à mudança no repertório de genes do sistema de reparo de DNA em relação às outras espécies de *Xanthomonas*. Das poucas diferenças encontradas, será interessante averiguar porque *X.*

oryzae é a única espécie dentro do gênero que não contém mecanismo de NHEJ de reparo haja visto a ausência do gene *ku*.

Dentre os genes que estão potencialmente sob influência de um IS, a detecção de seus níveis de expressão nas cepas que apresentam eventos de proximidade é um primeiro método de detecção de possíveis diferenças transcricionais influenciadas pelo elemento. Comum a todas as cepas de *X. oryzae*, *radA*, *mutM* e *mutS* representam três genes que são potencialmente influenciados pela presença de diversos ISs a montante e a jusante. Um experimento de evolução experimental relevante envolve a criação da linhagem mutante para estes genes e observação do número de elementos ao longo de gerações. Também nos questionamos se os elementos que circundam esse genes, são (ou apresentam indícios que foram) capazes de formar transposons compostos, conferindo mobilidade a estes genes de reparo.

A descrição de MITE-Xo gerou diversos questionamentos que suportam uma avaliação experimental. É indispensável investigar se MITEs-Xo codificam elementos regulatórios e influenciam a vizinhança gênica de suas diversas inserções no genoma de *X. oryzae*. Também abordamos aqui, em caráter especulativo, o processamento de MITEs-Xo em pequenos RNAs e sua atuação na interação com o hospedeiro. A pesquisa de pequenos RNA, ambos intracelular e inter-sistemas ocorre hoje através da análise de expressão diferencial, que apesar da produção de um altíssimo volume de dados, proporcionalmente gera uma quantidade bem menor de alvos testáveis. Será muito interessante entender se a partir de análise bioinformática anterior à experimental, como a descrita neste trabalho, é capaz de desvendar alvos de significância biológica.

Apesar de sua natureza autônoma (muitas vezes referida como egoística), deixamos evidente com este trabalho que a dinâmica da estrutura populacional pode ser apreciada pelo ângulo dos elementos de transposição. A comparação dos fenômenos observados entre linhagens africanas e linhagens asiáticas é recorrente por toda a tese. Em *Xoo*, a linhagem africana AXO1947é muito distinta das cepas asiáticas na quantidade de elementos IS presentes e nos eventos de proximidade de ISs e genes de reparo. E somente um MITE-Xo nesta cepa é compartilhado com o restante de *Xoo* ou *Xoc*.

Em *Xoc*, o perfil de distribuição de MITEs-Xo nas linhagens africanas revelam uma maior heterogeneidade, com diversos grupos sintênicos exclusivos às linhagens africanas. Os eventos de proximidade de ISs a genes de reparo são mais frequentes nas linhagens *Xoc* africanas e, há ainda alguns casos o elemento próximo ao gene de reparo difere no grupo asiático e africano. O quanto a recente intensificação da agricultura moderna e a diversificação do hospedeiro (utilização de *O. glaberrima* e variedades híbridas de *O. sativa* e *O. glaberrima* na produção de arroz, particular ao continente africano) reconfigura a estrutura populacional do patógeno permanece sob investigação. Nosso trabalho sugere

que elementos de transposição, que podem atuar neste processo, também auxiliam na investigação da dinâmica de populações bacterianas.

O conceito de espécie, assim como o processo de especiação, são temas polêmicos no grupo Bacteria (e, na verdade, em qualquer um dos Domínios da vida) e seria insensato atribuir aqui um valor aos elementos de transposição neste processo em *X. oryzae*. No entanto, nosso conjunto de resultados reitera a importância dos elementos de transposição na variabilidade genética de populações, e dessa forma, infere sobre seu papel relevante na diversificação dessa linhagem.

A contribuição dos elementos móveis na diversificação de uma população clonal tem sido progressivamente explorada, principalmente devido o destaque deste tipo de componente genômico no surgimento de novos patógenos. Neste trabalho, descrevemos essa fonte de variabilidade tanto entre os patovares de *X. oryzae* como dentro de cada patovar. O resultado aqui apresentado é um avanço na caracterização da influência de elementos móveis na diversificação de genomas, uma vez que explora as consequências geradas pelos elementos de transposição e evidencia a complexidade desta variação em nível populacional.