

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE ZapA E ZapB DE *Xanthomonas citri*  
subsp. *citri* NA DIVISÃO CELULAR E SEGREGAÇÃO CROMOSSÔMICA**

**GIOVANE BÖERNER HYPOLITO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

**Rio Claro - SP  
Julho - 2021**

GIOVANE BÖERNER HYPOLITO

**Investigação do envolvimento de ZapA e ZapB de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*  
na divisão celular e segregação cromossômica**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia do Campus de Rio Claro,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Rio Claro - SP  
2021

H998i Hypolito, Giovane Böerner  
Investigação do envolvimento de ZapA e ZapB de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na divisão celular e segregação cromossômica / Giovane Böerner Hypolito. -- Rio Claro, 2021  
69 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Henrique Ferreira

1. Mutagenese. 2. Cancro (Fitopatologia). 3. Genética microbiana. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Investigação do envolvimento de ZapA e ZapB de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na divisão celular e segregação cromossômica

**AUTOR: GIOVANE BÖERNER HYPOLITO**

**ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

*Daiane Cristina Sass*

Dr. FRANKLIN BEHLAU (Participação Virtual)  
FUNDECITRUS / Fundo de Defesa da Citricultura



Rio Claro, 31 de maio de 2021

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Henrique Ferreira, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, além da oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Agradecer principalmente pela paciência e por todo aprendizado que me deu.

Aos integrantes do LGB, Caio, Mateus, Guilherme, Léo, Nathália, Mario e Hayen. Por todos os momentos de ensinamento, ajuda, risada e alegria que tivemos no laboratório.

Aos meus pais, Marcos e Ester Solange. Se eu estou aqui hoje em dia é por toda oportunidade que vocês me deram e acreditaram em mim.

Às minhas irmãs, Thelma e Daniele. Por todas as memórias felizes e alegres que me proporcionaram durante esse período.

Ao meu parceiro, Michel, pela companhia, apoio, e compreensão que tem por mim

Aos amigos que realizei, Gabrielle e Vitor, pelas conversas e risadas.

Aos meus amigos da graduação e infância, pelos momentos de descontração e parar um pouco para relaxar

Ao meu gato Pitoco, que surgiu no fim desse trabalho para me dar alegria

Aos mentores presentes na minha vida.

Ao CNPq pela bolsa de estudo.

## RESUMO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp *citri* (*X. citri*) é um fitopatógeno que ataca todas as variedades comerciais de citros, causando impacto significativo para a produção mundial de laranjas. A doença causada por esta bactéria é conhecida como cancro cítrico, que produz lesões corticosas salientes nos frutos, diminuindo a produtividade e qualidade dos mesmos. Até o presente, não há cura para a cancro cítrico, sendo o manejo da doença uma das formas de controle utilizada para se evitar grandes perdas econômicas. Alternativamente, o estudo da biologia do patógeno possibilita o desenvolvimento de estratégias de controle utilizando compostos antibacterianos capazes de inibir alvos/processos vitais tais como a divisão celular. A maquinaria responsável pela divisão bacteriana é formada principalmente pela proteína FtsZ, uma tubulina ancestral que forma o anel-Z no centro das células em divisão. O anel-Z recruta diversas proteínas que atuarão no processo de divisão, bem como outras com função acessória na modulação de sua montagem. Caracterizar a função destas proteínas constitui uma forma de ampliar nossos alvos para o desenvolvimento de novos compostos inibidores de divisão celular, forma esta que constitui uma alternativa de controle do cancro cítrico. Neste trabalho, caracterizamos duas proteínas acessórias, ZapA e ZapB, codificadas por este patógeno. Investigamos suas funções avaliando o fenótipo de mutante de *X. citri* com deleção de *zapB* (XAC\_RS17260) e *zapA* (XAC\_RS17265). Nossos resultados mostraram que a deleção do gene *zapB* provocou a formação de cadeias e aumento do comprimento das células, o que indica que este gene participa na divisão em *X. citri*. Além disso, a deleção do gene *zapA* não provocou alterações no fenótipo celular. Tanto a ausência de ZapA quanto de ZapB não alteraram a viabilidade celular, indicando que essas proteínas não são essenciais para a sobrevivência de *X. citri*. A expressão da fusão GFP-ZapB nas células de  $\Delta zapA$  mostraram que o recrutamento da proteína ZapB para o septo de divisão em *X. citri* é dependente de ZapA. Em relação a virulência, a ausência dessas proteínas não prejudicou a capacidade de infecção de plantas hospedeiras. Esse trabalho mostrou que as proteínas ZapA e ZapB em *X. citri* participam dos processos de divisão celular e fornecem subsídios para um melhor entendimento deste processo neste fitopatógeno.

**Palavras-chaves:** Mutagênese. Cancro (Fitopatologia). Genética Microbiana.

## ABSTRACT

The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) is a phytopathogen that attacks all commercial varieties of citrus, causing a significant impact on the worldwide production of oranges. The disease caused by this bacterium is known as citrus canker, which produces cortical lesions in the fruit, decreasing their productivity and quality. To date, there is no cure for citrus canker, and in order to control the disease, integrated management measures are used to avoid major economic losses. In this context, the study of the biology of the pathogen enables the development of control strategies using antibacterial compounds capable of inhibiting vital processes such as cell division. The machinery responsible for the bacterial division is formed mainly by the FtsZ protein, an ancestral tubulin that forms the Z-ring in the center of dividing cells. The Z-ring recruits several proteins that will act in the division process, as well as others proteins with an accessory function that modulates its assembly. Characterizing the function of these proteins is a way of expanding our targets for the development of new compounds that inhibit cell division and may present extra alternatives for controlling citrus canker. In this work, we characterize two accessory proteins, ZapA and ZapB, encoded by this pathogen. We investigated its functions by evaluating the *X. citri* mutant phenotype with *zapB* (XAC\_RS17260) and *zapA* (XAC\_RS17265) deletion. Our results showed that the deletion of the *zapB* gene caused the formation of chains and increased cell length, which indicates that this gene participates in the division in *X. citri*. In addition, the deletion of the *zapA* gene did not cause changes in the cell phenotype. Both absence of ZapA and ZapB did not alter cell viability, indicating that these proteins are not essential for the survival of *X. citri*. The expression of the GFP-ZapB fusion in  $\Delta zapA$  cells showed that recruitment of the ZapB protein to the *X. citri*-dividing septum is ZapA-dependent. Regarding virulence, the absence of these proteins did not impair the ability of *X. citri* to infect host plants. This work showed that the proteins ZapA and ZapB in *X. citri* participate in the processes of cell division and contributes for a better understanding of this process in this phytopathogen.

**Keywords:** Mutagenesis. Canker (Phytopathology). Microbial Genetics.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Tabela dos oligonucleotídeos usados para a deleção do gene <i>zapB</i> . .....	26
<b>Tabela 2</b> – Tabela dos oligonucleotídeos usados para a deleção do gene <i>zapA</i> . .....	26
<b>Tabela 3</b> – Reação de PCR com as concentrações dos reagentes para a polimerase Pfu. ....	27
<b>Tabela 4</b> – Reação de PCR com as concentrações dos reagentes para a polimerase PCR SuperMix. ....	28
<b>Tabela 5</b> – Ciclo de amplificação dos fragmentos na deleção do gene <i>zapB</i> . .....	28
<b>Tabela 6</b> – Ciclo de amplificação dos fragmentos na deleção do gene <i>zapA</i> . .....	28
<b>Tabela 7</b> – Tabela da porcentagem de fenótipos .....	42
<b>Tabela 8</b> – Tabela das comparações das medidas de comprimentos ( $\mu\text{m}$ ) entre <i>X. citri</i> , $\Delta\text{zapB}$ 11 e $\Delta\text{zapB}$ 11 comp. ....	43
<b>Tabela 9</b> – Tabela das comparações das medidas de comprimentos ( $\mu\text{m}$ ) entre <i>X. citri</i> e $\Delta\text{zapA}$ 1; .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Lesões de cancro cítrico asiático em folha.....	14
<b>Figura 2</b> – Ilustração do sistema Min .....	18
<b>Figura 3</b> – Construção do vetor de deleção pNPTS138 do gene <i>zapB</i> .....	31
<b>Figura 4</b> – Construção do vetor de deleção pNPTS138 do gene <i>zapA</i> .....	31
<b>Figura 5</b> – Gel de agarose com os produtos de PCR para a confirmação da deleção do gene <i>zapB</i> .....	33
<b>Figura 6</b> – Gel de agarose com os produtos de PCR para a confirmação da deleção do gene <i>zapA</i> . .....	34
<b>Figura 7</b> – Teste de amido para confirmar se os vetores pGCD21-GFP- <i>zapB</i> e pGCD21-GFP- <i>zapA</i> integraram nas células de <i>X. citri</i> e <i>X. citri</i> $\Delta$ <i>zapB</i> . .....	35
<b>Figura 8</b> - Teste de amido para confirmar se vetores pGCD21-GFP- <i>zapB</i> e pGCD21-GFP- <i>zapA</i> integraram nas células de <i>X. citri</i> e <i>X. citri</i> $\Delta$ <i>zapA</i> . .....	36
<b>Figura 9</b> – Curva de crescimento populacional de <i>X. citri</i> (linha azul) e mutantes $\Delta$ <i>zapB</i> (demais linhas). .....	39
<b>Figura 10</b> – Curva de crescimento populacional de mutante $\Delta$ <i>zapB</i> 11 (linha vermelha) e <i>X. citri</i> (linha azul) em meio NYG. ....	39
<b>Figura 11</b> – Curva de crescimento populacional de mutante $\Delta$ <i>zapB</i> 11 (linha vermelha) e <i>X. citri</i> (linha azul) em meio NB.....	40
<b>Figura 12</b> – Curva de crescimento populacional de mutante $\Delta$ <i>zapB</i> 11 (linha vermelha) e <i>X. citri</i> (linha azul) em meio NBY.....	40
<b>Figura 13</b> – Curva de crescimento populacional de mutante $\Delta$ <i>zapB</i> 11 (linha vermelha) e <i>X. citri</i> (linha azul) em meio XVM2. ....	41
<b>Figura 14</b> – Análise morfológica celular para a ausência da proteína ZapB.....	42
<b>Figura 15</b> – Análise do nucleóide para a ausência da proteína ZapB.....	44
<b>Figura 16</b> – Análise do septo de divisão para a ausência da proteína ZapB .....	46
<b>Figura 17</b> – Curva de crescimento populacional de <i>X. citri</i> (azul) e mutantes $\Delta$ <i>zapA</i> 1 (demais linhas). .....	49
<b>Figura 18</b> - Curva de crescimento populacional de mutante $\Delta$ <i>zapA</i> 1 (linha vermelha) e <i>X. citri</i> (linha azul) em meio NYG. ....	49
<b>Figura 19</b> – Curva de crescimento populacional de mutante $\Delta$ <i>zapA</i> 1 (linha vermelha) e <i>X. citri</i> (linha azul) em meio NB. ....	50

<b>Figura 20</b> – Curva de crescimento populacional de mutante $\Delta zapA$ 1 (linha vermelha) e <i>X. citri</i> (linha azul) em meio NBY.....	50
<b>Figura 21</b> - Curva de crescimento populacional de mutante $\Delta zapA$ 1 (linha vermelha) e <i>X. citri</i> (linha azul) em meio XVM2.....	51
<b>Figura 22</b> – Análise morfológica do septo de divisão no mutante $\Delta zapA$ 1.....	52
<b>Figura 23</b> – Análise do nucleóide para a ausência da proteína ZapA. ....	54
<b>Figura 24</b> – Teste de patogenicidade com as linhagens <i>X. citri</i> (controle), $\Delta zapB$ 11, $\Delta zapB$ 11 comp. e $\Delta zapA$ 1.....	56

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Citricultura, o cancro cítrico e agente etiológico</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Divisão celular</b> .....	<b>15</b>
2.2.1 <i>Formação do anel-Z</i> .....	15
2.2.2 <i>Regulação do anel-Z</i> .....	17
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	<b>22</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>23</b>
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>6.1 Linhagens bacterianas e cultivo</b> .....	<b>24</b>
<b>6.2 Procedimentos gerais de biologia molecular</b> .....	<b>24</b>
<b>6.3 Deleção dos genes <i>zapA</i> e <i>zapB</i></b> .....	<b>25</b>
6.3.1 <i>Desenho dos oligonucleotídeos de deleção (Primers)</i> .....	25
6.3.2 <i>Amplificação dos fragmentos de deleção</i> .....	26
6.3.3 <i>Preparo das células quimicamente competentes de E. coli DH10B</i> .....	29
6.3.4 <i>Ligação dos fragmentos upstream e downstream dos genes <i>zapB</i> e <i>zapA</i> no vetor de deleção pNPTS138</i> .....	29
6.3.5 <i>Preparo de células eletrocompetentes de X. citri</i> .....	32
6.3.6 <i>Transformação dos vetores de deleção em células eletrocompetentes de X. citri</i> .....	32
6.3.7 <i>Complementação mutantes <math>\Delta zapB</math> e <math>\Delta zapA</math></i> .....	34
6.3.8 <i>Marcação dos genes <i>zapB</i> e <i>zapA</i> em fusão com proteína fluorescente GFP</i> .....	34
<b>6.4 Microscopia</b> .....	<b>36</b>
<b>6.5 Curva de crescimento populacional</b> .....	<b>37</b>
<b>6.6 Testes de patogenicidade – infiltração</b> .....	<b>37</b>
<b>6.7 Teste do amido</b> .....	<b>37</b>
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7.1 Caracterização do mutante <i>X. citri</i> <math>\Delta zapB</math></b> .....	<b>38</b>
7.1.1 <i>Curva de crescimento populacional de X. citri <math>\Delta zapB</math></i> .....	38
7.1.2 <i>Microscopia do mutante X. citri <math>\Delta zapB</math></i> .....	41
7.1.3 <i>Microscopia do nucleóide do mutante X. citri <math>\Delta zapB</math></i> .....	43

7.1.4 Microscopia do septo de divisão do mutante <i>X. citri</i> $\Delta$ zapB.....	45
7.1.5 Complementação do mutante <i>X. citri</i> $\Delta$ zapB.....	47
<b>7.2 Caracterização do mutante <i>X. citri</i> <math>\Delta</math>zapA.....</b>	<b>47</b>
7.2.1 Curva de crescimento populacional do mutante <i>X. citri</i> $\Delta$ zapA.....	47
7.2.2 Microscopia do mutante <i>X. citri</i> $\Delta$ zapA.....	51
7.2.3 Microscopia do nucleóide do mutante <i>X. citri</i> $\Delta$ zapA.....	53
7.2.4 Microscopia do septo de divisão do mutante <i>X. citri</i> $\Delta$ zapA.....	54
7.2.5 Complementação do mutante <i>X. citri</i> $\Delta$ zapA.....	55
<b>7.2 Teste de patogenicidade dos mutantes <i>X. citri</i> <math>\Delta</math>zapB e <i>X. citri</i> <math>\Delta</math>zapA.....</b>	<b>55</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* pertence a um dos cultivos mais importante comercialmente no mundo, além desse gênero, outros, como *Fortunella* e *Poncirus*, têm exemplares de importância econômica também, todos esses gêneros fazem parte da família Rutaceae (NEVES et al., 2010). Os cultivos pertencentes ao gênero *Citrus* são laranjas, limões, limas, tangerinas, entre outros. No Brasil, o principal cultivo é a laranja doce, a qual é responsável por uma grande porcentagem da atividade econômica do país, além de gerar empregos desde a área rural até a industrial (JUNIOR et al., 2005). A produção nacional de citrus foi de 16,9 milhões de toneladas (USDA, 2021), porém, a região Sudeste é responsável pela maior parte da produção, sendo o estado de São Paulo o principal produtor. O cinturão citrícola de São Paulo teve uma produção total de laranja de 268,63 milhões de caixas de 40,8 kg em 2021 (FUNDECITRUS, 2021)

É de extremo interesse dos agricultores em obter a maior produtividade e qualidade que os pomares podem oferecer, ou seja, impedir que pragas e/ou doenças ataquem esses pomares, colocando em risco a produção e qualidade das laranjas. Uma das principais doenças que afetam os citros comerciais é o cancro cítrico asiático, cujo agente etiológico é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, pertencente à família Xanthomonadaceae (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). A doença foi detectada no estado de São Paulo, na cidade de Presidente Prudente, e como o Brasil apresenta um clima subtropical, sua proliferação e dispersão para os estados vizinhos e regiões proximais foi facilitada (BITANCOURT, 1957)

Uma das formas de controlar e erradicar patógenos é pela produção de compostos químicos que inibem o aparato da divisão celular, o anel-Z, e para isso precisa-se ter conhecimento das proteínas que formam esse sistema, suas funções e como elas interagem entre si, para então formular estratégias de como inibi-las (LOCK; HARRY, 2008). O anel-Z é formado por diversas proteínas que se polimerizam para forma sua estrutura final e iniciar o processo de septação, e assim, separar a célula-mãe em duas. Dentre essas proteínas uma é essencial para a formação da maquinaria, a *Filamentous temperature-sensitive Z* (FtsZ), que se compara à proteína tubulina encontrada nos eucariotos (ERICKSON; ANDERSON; OSAWA, 2010). Entretanto, dentre essa gama de proteínas existentes, há duas proteínas que se associam ao anel-Z, a ZapA e a ZapB, as quais participam da estabilização do mesmo (EBERSBACH et al., 2008; GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Há estudos que indicam que a ZapB se associa a proteína MatP que se liga ao macro domínio TER da região terminal da segregação cromossômica o que poderia exercer um mecanismo regulatório da divisão/segregação (ESPÉLI et al., 2012; MÄNNIK et al., 2016).

Com isso, esse trabalho analisou o fenótipo da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* linhagem 306 com a deleção do gene *zapA* e *zapB*, e observou se a falta de ZapA e ZapB promovem erros de divisão e/ou segregação cromossômica. Nosso laboratório trabalha com o desenvolvimento de estratégias e compostos químicos para controlar o cancro cítrico, portanto, é fundamental que se tenha conhecimento dos mecanismos moleculares da divisão celular, já que este é um dos processos fundamentais dos organismos e excelente para desenvolver estratégias para combater a proliferação e dispersão de microrganismos patogênicos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Citricultura, o cancro cítrico e agente etiológico

O cancro cítrico é uma doença que afeta a produção de citros, impactando a economia mundial. O cancro cítrico era classificado em “tipos”, sendo que o que determinava a classificação era as características dos sintomas e a gama de hospedeiros (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020). Inicialmente os tipos encontrados eram: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (tipo A), *X. citri* pv. *aurantifolii* (tipo B e C), e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* (tipo E) (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020). Em 1980, foi registrado um tipo D, porém foi descoberto que era causado por um fungo, *Alternaria limicola*, e com isso reclassificado (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020). Os tipos B e C desapareceram do campo devido à perda de genes importante para a patogenicidade (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020).

O tipo A, o qual é o organismo de estudo desse trabalho, é considerado a forma mais severa pela sua grande dispersão pelo mundo e dos impactos graves que ela causa na planta, alguns desses impactos podem ser o surgimento de erupções nas folhas e frutos e queda dos mesmos (BEHLAU; GOCHEZ; JONES, 2020; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). A bactéria *X. citri* é Gram-negativa, com morfologia bacilóide e delgada, apresenta um flagelo unipolar para motilidade, sendo obrigatoriamente aeróbia (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; GRAHAM et al., 2004).

Quando a bactéria chega a um hospedeiro sadio pela ação do vento, chuva ou máquinas e roupas dos trabalhadores contaminadas (BOCK; PARKER; GOTTWALD, 2005; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Ela penetra no tecido foliar por aberturas naturais (estômatos) ou por ferimentos, os quais podem ter sido provocados pela larva minadora, *Phyllocnistis citrella*, iniciando assim o processo de infecção (CHAGAS et al., 2001; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002; SCHUBERT et al., 2001). Durante a infecção, o produto do gene *pthA*, o qual pertence à família AvrBs3/PthA (efetores TAL), é injetado no hospedeiro pelo sistema de secreção bacteriano tipo III, onde ele atua na alteração da transcrição de vários genes que favorecem a infecção (DOMINGUES et al., 2010; SWARUP et al., 1992). Genes responsáveis pela divisão e crescimento celular, formação de parede celular vegetal, síntese de ribossomo, entre outros. Tais mudanças levam a hiperplasia (divisão desordenada das células) e hipertrofia (inchaço celular), as quais se desenvolvem nos cancros, onde as lesões ficam com um halo clorótico e com uma cor amarronzada (Figura 1) (CERNADAS; CAMILLO; BENEDETTI, 2008; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Por último,

o patógeno tem mais facilidade em infectar plantas jovens, pois são menos resistentes, e a colonização depende do órgão em que a bactéria foi dispersada (BEHLAU et al., 2007; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

**Figura 1** – Lesões de cancro cítrico asiático em folha.



Fonte: acervo pessoal

No Brasil, o cancro cítrico foi detectado pela primeira vez em 1957 no estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957), e a partir desse momento houve esforços para a erradicação e controle da proliferação da doença (BEHLAU, 2020). Nos anos iniciais, que ficou conhecido como “fase de emergência”, o controle das plantas contaminadas era pela eliminação da planta contaminada e das plantas vizinhas dentro de um raio de 12 m (BEHLAU, 2020). Entretanto essas medidas não estavam sendo suficientes então foi implementado um plano de “erradicação total”, o qual possuía medidas bastante rigorosas (BEHLAU, 2020). Com isso, em 1961, em algumas áreas e municípios o cancro conseguiu ser eliminado. Porém outros focos da doença foram encontrados e ela se alastrou para outras regiões do estado de São Paulo (BEHLAU, 2020)

Durante os anos houve várias mudanças no protocolo de erradicação e controle do cancro cítrico. Entretanto entre os anos de 1999-2009 foi o protocolo mais eficiente já adotado para o controle da doença (BEHLAU, 2020). Esse protocolo consistia na erradicação da planta contaminada e das plantas vizinhas do mesmo talhão (área com as plantas que tem a mesma

idade, variedade e porta-enxerto) respeitando a percentagem de contaminação (0,5%), acima disso era feita a eliminação da planta contaminada e das demais em um raio de 30 metros (BEHLAU; FONSECA; BELASQUE JR, 2016; BELASQUE JR.; FERNANDES; MASSARI, 2009). A partir do ano de 2009, houve um afrouxamento das normas referentes as plantas contaminadas, o que causou o aumento da proliferação da doença, de 2017 a 2018 houve um aumento de 35%, sem contar os anos anteriores (BEHLAU, 2020; BELASQUE JR. et al., 2010). O afrouxamento se iniciou com a Resolução SAA n. 43, de 25/06/2009, onde a erradicação das plantas vizinhas deixou de ser por talhões e permaneceu apenas a eliminação das plantas em um raio de 30 metros. Depois com a Resolução n. 147, de 31/10/2013, a erradicação passou a ser somente da planta contaminada e recobrimento das plantas vizinhas com cobre. Entretanto, o uso de cobre apresenta muitas desvantagens, como fitotoxicidade e o acúmulo no solo, além de que já foi observado linhagens de *Xanthomonas citri* com resistência a ele (BEHLAU et al., 2011).

Por último, pela Instrução Normativa nº 21, de 25 de abril de 2018, estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) há quatro *status* fitossanitários para o controle e prevenção do cancro cítrico. Os dois primeiros *status* são conhecidos como: área sem ocorrência e área livre da praga. O primeiro é estado onde não há ocorrência da doença e o segunda é área que não está contaminada, mas há a presença do patógeno dentro do estado ou a incidência é desconhecida. A terceira classificação é área sob erradicação onde há baixa incidência da doença e o controle é feito pela eliminação das plantas doente, monitoramento das plantas e uso de cobre ou eliminação das plantas vizinhas. O último *status* é área sob sistema de mitigação de risco, onde há alto índice da doença, onde o estado de São Paulo está inserido. Nesse *status* a eliminação da planta contaminada não é eficiente, portanto, é adotado estratégias que visam reduzir o impacto da doença na produção de frutos e na disseminação. Dentro das áreas de mitigação de risco é feita a utilização de mudas saudáveis, cultivares mais resistentes à doença, uso de cobre, utilização de quebra-ventos e controle da larva minadora de citro (BEHLAU, 2020). Sendo assim, é essencial que se tenha conhecimento da biologia básica da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* para o desenvolvimento de novos fármacos ou estratégias de combate para ampliar cada vez mais as opções de combate contra o cancro cítrico.

## **2.2 Divisão celular**

### *2.2.1 Formação do anel-Z*

A divisão celular é um processo vital tanto para procariotos quanto para eucariotos. No caso dos eucariotos a mitose serve para o crescimento e renovação celular dos organismos, enquanto, a meiose faz a redução cromossômica para a formação de um novo indivíduo, com exceções em ambos os casos. Nos procariotos a divisão celular tem o objetivo na formação de novos organismos, garantindo a sobrevivência e dispersão das espécies. Com isso, a divisão celular procariótica é uma excelente ferramenta para se estudar e desenvolver estratégias de controle microbiano (LOCK; HARRY, 2008). A maquinaria da divisão celular é formada por diversas proteínas, entretanto, uma proteína específica é responsável por formar um anel (anel-Z) no centro dos microrganismos onde será iniciado a formação do septo e posteriormente a separação das suas células-filhas por citocinese (ERICKSON; ANDERSON; OSAWA, 2010; LUTKENHAUS, 2007).

Dentro da família das proteínas “filamentation temperature sensitive” (Fts), encontra-se a proteína chave para todo esse processo, a FtsZ, que logo foi comparada sua homologia com as tubulinas encontradas nos eucariotos (BERMUDES; HINKLE; MARGULIS, 1994; LÖWE; AMOS, 1998; LUTKENHAUS; WOLF-WATZ; DONACHIE, 1980; NOGALES et al., 1998). O gene *ftsZ* é altamente conservado tanto em bactérias quanto em Archaea, além disso, sequências homólogas de FtsZ foram encontradas em cloroplastos e mitocôndrias (ERRINGTON; DANIEL; SCHEFFERS, 2003; KIEFEL, 2004; OSTERYOUNG; VIERLING, 1995; WANG; LUTKENHAUS, 1996). O anel-Z é formado pela polimerização dos monômeros de FtsZ, devido a sua atividade GTPase, as quais formam hélices que se condensam constituindo assim a estrutura do anel (ERICKSON; ANDERSON; OSAWA, 2010; LUTKENHAUS, 2007). A formação do septo pelo anel, e posteriormente o rompimento em duas células-filhas, é coordenada por várias outras proteínas que são recrutadas durante e após a formação do anel, sendo a FtsZ sinalizadora para o recrutamento, toda essa maquinaria é denominada de divisomo (ERRINGTON; DANIEL; SCHEFFERS, 2003; NANNINGA, 1998).

A montagem do divisomo segue uma ordem de recrutamento de proteínas, sendo a FtsZ a primeira a chegar no centro celular e sinalizadora do início desse recrutamento (VICENTE et al., 2006). O primeiro grupo a ser recrutado é: FtsA, ZipA e ZapA, as quais são independentes uma das outras, porém dependentes de FtsZ (HALE; DE BOER, 1997, 1999; VICENTE et al., 2006). Além disso, o complexo formado por FtsA e ZipA é necessário para o recrutamento das proteínas restantes do divisomo (PICHOFF, 2002). O segundo grupo é formado pelas proteínas: (FtsE, FtsX), FtsK, FtsQ, (FtsL, FtsB), FtsW, FtsI, FtsN, AmiC e EnvC (as proteínas entre parênteses ligam-se simultaneamente no divisomo) (BUDELMEIJER; BECKWITH, 2002; CHEN; BECKWITH, 2001; VICENTE et al., 2006). Essa hierarquia foi demonstrada em

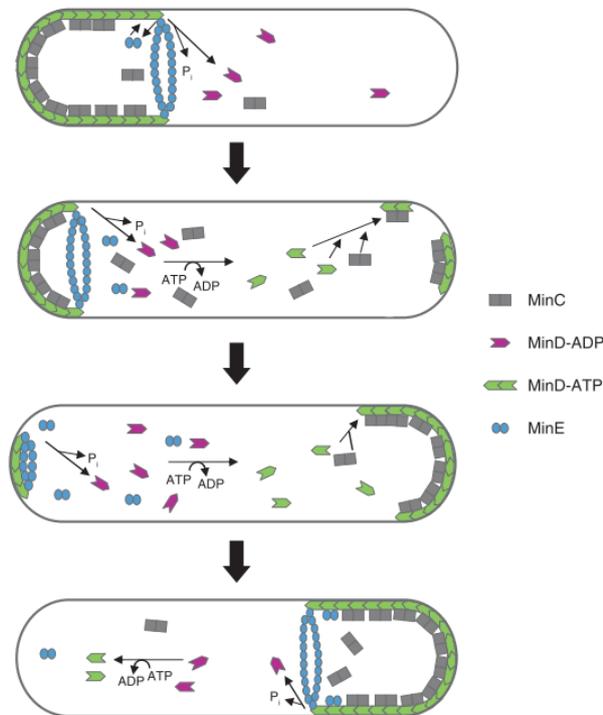
*E. coli*, entretanto, em *B. subtilis* a ordem hierárquica é diferente. O primeiro grupo a ser formado é: FtsZ, ZapA e SepF, as quais são todas dependentes de FtsZ. Posteriormente, há o recrutamento de DivIB (homóloga a FtsQ), DivIC, FtsL, PBP-2B e, provavelmente, FtsW. O recrutamento delas parecer acontecer de forma cooperativa, entretanto, não segue uma linearidade (ERRINGTON; DANIEL; SCHEFFERS, 2003).

### 2.2.2 Regulação do anel-Z

A localização e delimitação do anel-Z é coordenada por sistemas regulatórios negativos em relação a proteína FtsZ, como o sistema Min e “oclusão de nucleóide”, o que garante a formação do anel no centro das células dividindo-as em tamanhos iguais (LUTKENHAUS, 2007). O sistema Min é composto por três proteínas: MinC, MinD e MinE, as quais regulam FtsZ por um sistema de oscilação polo-polo. A proteína MinD possui atividade ATPase e um domínio de ligação para ATP. Quando ela está na sua conformação de ATP, ela se liga na membrana celular, o que acarreta na ligação e na ativação de MinC. A MinC na forma ativa inibe a polimerização da FtsZ, impedindo que ela forme o anel. A MinE garante que o complexo MinCD seja formado apenas nos polos, deixando a região central da célula com uma baixa concentração do complexo MinCD, possibilitando assim a polimerização de FtsZ. Ela forma um anel na região dos polos que catalisam o complexo MinCD liberando-os e repulsando-os para o outro polo (Figura 2) (HU et al., 1999; HU; LUTKENHAUS, 2001; LUTKENHAUS, 2007; RASKIN; DE BOER, 1999). O sistema Min de *Xanthomonas citri* é semelhante com o que foi visto em *Escherichia coli* com o mesmo padrão oscilatório, inclusive com o mesmo fenótipo quando o gene *minC* é deletado: células pequenas e filamentos curtos, além da formação de ramos (LORENZONI et al., 2017).

No modelo de “Oclusão de nucleóide”, proposto por Woldringh e colaboradores (1991) mostra que proteínas associadas ao cromossomo inibem a polimerização de FtsZ. Esse modelo foi validado com a descoberta do gene *yyaA* em *Bacillus subtilis*, que codifica uma proteína semelhante a Spo0J, que participa na segregação cromossômica (SIEVERS et al., 2002). Mais tarde, esse gene foi renomeado para *noc*, junto com a proteína que ele codifica, a qual é denominada Noc. Essa proteína impede a formação do anel-Z quando ela está ligada ao DNA, evitando que haja o “guilhotinamento” dos cromossomos pelo processo de divisão (WU; ERRINGTON, 2004). No caso de *Escherichia coli*, foi encontrada a SlmA, a qual é semelhante a Noc, com o papel de inibir a formação do anel-Z (BERNHARDT; DE BOER, 2005).

**Figura 2** – Ilustração do sistema Min. O sistema Min é um regulador negativo para a formação do anel-Z em que a proteína MinC inibi a formação dos protofilamentos de FtsZ. O complexo MinCD forma-se nas exterminadas das células devido a proteína MinE e com isso o anel-Z é formado no centro celular.



Fonte: Lutkenhaus (2007, p. 546)

Dentre as proteínas recrutadas por FtsZ, há algumas que agem como moduladores ou estimulantes para a construção do anel-Z, agindo de forma positiva, como é o caso das proteínas “*FtsZ associated protein*” (Zaps). Essas proteínas estabilizam os protofilamentos de FtsZ, unindo-os lateralmente para a formação do anel (DURAND-HEREDIA et al., 2012, 2011; EBERSBACH et al., 2008; GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002; MARTEYN et al., 2014). A primeira Zap foi caracterizada em *Bacillus subtilis* e denominada de ZapA cuja função está relacionada com a estabilização dos protofilamentos de FtsZ lateralmente (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Homólogos a ela foram encontrados em outros organismos e organelas: *Escherichia coli* (SMALL et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (LOW; MONCRIEFFE; LÖWE, 2004), mitocôndrias (YOSHIDA et al., 2009) e *Xanthomonas citri* (MARTINS et al., 2010). Apesar do seu papel na estabilização do anel, ela não é uma proteína essencial para a sua formação, em que a ausência da mesma não coloca em risco a viabilidade celular (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Por outro lado, a ZapA mostrou ser essencial em células, em que a

concentração de FtsZ foi reduzida, assim, foi possível observar sua ação positiva sobre o anel-Z (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002).

Outra proteína que faz parte da família das Zaps é a “B”, ela foi inicialmente descrita em *E. coli* (EBERSBACH et al., 2008). Sabe-se que a ZapB é responsável em fazer uma ligação entre o material genético e a maquinaria de divisão celular, por meio da associação entre MatP e ZapA em *E. coli* (BUSS et al., 2015; ESPÉLI et al., 2012; MÄNNIK et al., 2016). A ligação de ZapB no anel-Z é responsável pela ZapA, a qual recruta ZapB para o centro celular (GALLI; GERDES, 2010). MatP é uma proteína que interage com o macrodomínio terminal da segregação cromossômica, ligando-se aos sítios de assinaturas moleculares *matS* (ESPÉLI et al., 2012; MÄNNIK et al., 2016). Assim, as proteínas ZapA, ZapB e MatP formam uma rede proteica que estabilizam o anel-Z desde a membrana até o cromossomo (BUSS et al., 2015). Apesar da localização do anel-Z ser regulado positivamente (complexo ZapA-ZapB-MatP) e negativamente com os sistemas Min e oclusão de nucleóide, pode haver outros mecanismos que realizam essa regulação e que são desconhecidos (BAILEY et al., 2014).

A ZapC foi caracterizada primeiramente em *E. coli* (HALE et al., 2011). Ela é formada por um monômero composto por dois domínios, N-terminal e C-terminal, os quais apresentam “bolsos” (SCHUMACHER et al., 2016). O bolso da região N-terminal é uma região hidrofóbica que contém resíduos de aminoácidos importantes para a funcionalidade e sítio de ligação da proteína, por outro lado, o bolso da região C-terminal também é hidrofóbico, porém, com resíduos mais básicos (SCHUMACHER et al., 2016). Bhattacharya e colaboradores (2015) mostraram que a ligação de interação entre ZapC e FtsZ é não-iônica e hidrofóbica, com uma alta afinidade. Além disso, eles acreditam que como a ZapC liga-se entre os domínios N- e C-terminal de FtsZ, isso cria uma sobreposição de função junto com os outros reguladores positivos e promova a maturação do anel-Z e dos protofilamentos lateralmente (BHATTACHARYA et al., 2015; SCHUMACHER et al., 2016).

A ZapD como as outras Zaps não é uma proteína essencial para a divisão celular, entretanto, ela é recrutada por FtsZ na região mediana da célula (DURAND-HEREDIA et al., 2012). Ela interage com a região C-terminal de FtsZ unindo lateralmente os protofilamentos, estabilizando o anel-Z. Alguns estudos mostraram que a superexpressão do gene *zapD* afeta de certa forma a divisão com prováveis mudanças nos polímeros de FtsZ, além de deixar a célula com o fenótipo de filamentação. Por outro lado, o fenótipo  $\Delta zapD$  não alterou a morfologia das células. Entretanto quando tanto *zapA* e *zapD* foram deletadas as células ficaram com um fenótipo alongado. Com isso, foi possível observar que ZapD compartilha um papel funcional

com ZapA nos estágios iniciais da divisão (DURAND-HEREDIA et al., 2012; SCHUMACHER et al., 2017).

Marteyn e colaboradores (2014) foram os responsáveis em caracterizar a ZapE. Em seus estudos, eles mostraram que a ZapE é uma ATPase encontrada em bactérias Gram-negativas. Além disso, essa proteína faz parte do sistema de divisão e não é essencial em *E. coli* e *Shigella flexneri* em condições ótimas de crescimento. Entretanto, quando as bactérias foram colocadas para crescer na ausência de oxigênio ou em temperaturas acima de 37°C, a ZapE mostrou ser essencial onde células que não tinham a proteína ficaram alongadas e com problemas durante o crescimento. Diferente das ZapsABD que são recrutadas no início da divisão celular, ZapE é recrutada no final do processo e está relacionada com a constrição do anel-Z (MARTEYN et al., 2014).

### 3 JUSTIFICATIVA

O cancro cítrico é uma das doenças que mais afeta o cultivo de citros do mundo. Apesar de haver um controle e manejo da doença, ela ainda tem um grande impacto na economia nacional. Por isso, torna-se essencial que se tenha conhecimento da biologia básica do fitopatógeno, o que poderá oferecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias novas e mais sustentáveis para o combate do cancro cítrico. Assim, esse trabalho investigou as funções das proteínas ZapA e ZapB em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, que estão envolvidas em um processo essencial para a vida: a divisão celular e segregação cromossômica. Compreender seu funcionamento, e ser capaz de perturbar ou bloquear este processo tem direta relação com controlar a capacidade de proliferação do patógeno e, por conseguinte, sua capacidade de infectar o hospedeiro citros (SILVA et al., 2013).

#### **4 HIPÓTESE**

A falta de ZapB e ZapA em *X. citri* pode promover erros de divisão celular e segregação cromossômica, podendo interferir com a sobrevivência e patogenicidade deste fitopatógeno.

## 5 OBJETIVOS

Estudo funcional de ZapB e ZapA de *X. citri* e seu envolvimento nos processos de divisão celular e segregação cromossômica

### 5.1 Objetivos específicos

- Nocautear o gene *zapB* (XAC\_RS17260): foi investigado se a ausência do gene *zapB* provocaria alterações morfológicas, de crescimento, de patogenicidade e se causaria erros de divisão e/ou segregação cromossômica de *X. citri*, uma vez que, o gene *zapB* relaciona-se com esses dois processos.
- Nocautear o gene *zapA* (XAC\_RS17265): foi investigado se a ausência de ZapA provocaria alterações morfológicas, de crescimento e patogenicidade nas células de *X. citri*. Além disso, foi estudado se a proteína ZapB é dependente de ZapA para ser recrutada no septo de divisão por microscopia de fluorescência em fusão com a proteína GFP.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Linhagens bacterianas e cultivo

A linhagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizada para o estudo foi o isolado 306 (SHAAD *et al.*, 2006) (IBSBF1594). *X. citri* foi cultivada em meio NYG (peptona 5 g/L, extrato de levedura 3 g/L e glicerol 20 g/L) a 30°C com ou sem ágar 1,5%. Para os passos de clonagem utilizamos *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen), que foi cultivado em meio LB (SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, 1989) a 37°C, com ou sem ágar 1,5%. Quando necessário, foi adicionado ao meio de cultivo canamicina ou ampicilina na concentração de 20 µg/ml.

Para os testes de crescimento populacional, os meios selecionados foram NYG; NB (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona para 1 L, pH: 6,8 - 7,0; LYU *et al.*, 2020); NBY (0.8% NB, 0.2% extrato de levedura, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25% glicose) suplementado com 20 mL de glicose (10%) e 1 mL de 1 M MgSO<sub>4</sub> por litro (AMARAL *et al.*, 2005); XVM2 (20 mM NaCl; 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 5 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,16 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,32 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,01 mM FeSO<sub>4</sub>; 10 mM frutose; 10 mM sacarose; 0,03% casaminoácidos (pH 6,7) (WENGELNIK *et al.*, 1996).

### 6.2 Procedimentos gerais de biologia molecular

Todos os procedimentos de biologia molecular seguiram as técnicas de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Utilizamos o kit Invisorb Spin Tissue Mini (Invitek, código 10321003) para a extração de DNA total de *X. citri*. Extração do DNA plasmidial foi feita a partir do kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, código K0502). A purificação do DNA e a extração de gel de agarose 0,7%, quando necessária, foram feitas com o kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, código K0691). Para as reações de ligações utilizamos a enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, código EL0011). As transformações em *E. coli* foram realizadas por choque-térmico, onde as células são tratadas com cloreto de cálcio para ficarem quimicamente competentes (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Além disso, as transformações em *X. citri* seguiram o protocolo de eletroporação de Ferreira e colaboradores (1995) com algumas alterações. Os primers para a amplificação dos genes desse estudo foram baseados do sequenciamento da *X. citri* 306 (SILVA *et al.*, 2002) depositado no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), código de acesso NC\_003919.1. Para a visualização do genoma utilizamos o *software* Artemis v. 17.0.1 (CARVER *et al.*, 2012) e para

a construção e checagem dos primers utilizamos o *software* Gene Runner v. 6.5.52 (FRANK BUQUICCHIO; MICHAEL SPRUYT, 2019). Os primers (Apêndice A) foram modificados de acordo com o sítio de clivagem de enzima de restrição para permitir a clonagem adequado nos vetores e foram sintetizados pela empresa IDT. Toda construção de vetor feita nesse trabalho teve sua confirmação final feita por sequenciamento de sanger pela empresa Macrogen. A tabela com os vetores e suas descrições estão no Apêndice B e os mapas dos vetores no Apêndice C.

### **6.3 Deleção dos genes *zapA* e *zapB***

#### *6.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos de deleção (Primers)*

Primeiramente, os genes foram localizados no genoma de *X. citri* para que pudesse ser feito o desenho dos primers de deleção. O gene *zapA* (XAC\_RS17265) tem um tamanho de 300 pb e está localizado entre as coordenadas genômicas 4014887..4015186, já o gene *zapB* (XAC\_RS17260) possui um tamanho de 222 pb e está localizado na coordenada 4014669..4014890. Para a deleção dos genes utilizamos o método de Lacerda e colaboradores (2017). Com isso, os genes são deletados por dupla recombinação homóloga (troca alélica), utilizando um vetor suicida em *X. citri*. Para isso, foi desenhado quatro oligonucleotídeos (A, B, C, D) para cada ORF (Tabelas 1 e 2) utilizando o genoma da *X. citri* disponível no banco de dados Genbank do The National Center for Biotechnology Information – NCBI. Os oligonucleotídeos B e C possuem nas extremidades 3' e 5', respectivamente o mesmo sítio de clivagem para endonucleases. Já, os oligonucleotídeos A e D possuem nas extremidades 5' e 3', respectivamente, os mesmos sítios para endonucleases disponíveis no vetor para que ocorra a inserção dos fragmentos de forma adequada.

**Tabela 1** – Tabela dos oligonucleotídeos usados para a deleção do gene *zapB*.

Produto	Primer	Sequência 5' – 3'	Amplicon (pb)
Fragmento <i>upstream</i>	3407 UpF (F)*	AAA <b>ACTAGT</b> AAGATCAGAATCG CCTGCTC	905
(A-B)	3407 UpR (R)*	GCTGCTCCAATGACT <b>AGATCTGC</b> GCTCACGATAGGGG	
Fragmento <i>downstream</i>	3407 DownF (F)*	CCCCTATCGTGAGCGC <b>AGATCTA</b> GTCATTGGAGCAGCACACG	941
(B-C)	3407 DownR (R)*	AAA <b>AGCTT</b> AATCGGTGTCGCA TTGTC	

\*(F) Sequência do primer direito (Forward); Sequência do primer reverso (Reverse). As sequências em azul, vermelho e verde corresponde ao sítio de restrição da enzima *SpeI*, *BglII*, *HindIII*, respectivamente.

**Tabela 2** – Tabela dos oligonucleotídeos usados para a deleção do gene *zapA*.

Produto	Primer	Sequência 5' – 3'	Amplicon (pb)
Fragmento <i>upstream</i>	Up_ <i>zapAF</i> (F)*	AAA <b>ACTAGT</b> GCCTTCTTCGCTCAGCGC CGG	852
(A-B)	Up_ <i>zapAR</i> (R)*	GATGGCAGTGCGAATTCCAC <b>CCATGG</b> TCACGTGTGCTGCTC	
Fragmento <i>downstream</i>	Down_ <i>zapA</i> F (F)*	AA <b>CCATGGG</b> TGGAATTCGCACTG	877
(B-C)	Down_ <i>zapA</i> R (R)*	TT <b>GTGCA</b> CCGCGCCCATCCAGTACCG	

\*(F) Sequência do primer direito (Forward); Sequência do primer reverso (Reverse). As sequências em azul, vermelho e verde corresponde ao sítio de restrição da enzima *SpeI*, *NcoI* e *SalI*, respectivamente.

### 6.3.2 Amplificação dos fragmentos de deleção

As reações de ambos fragmentos, *upstream* e *downstream*, para os genes *zapB* e *zapA* estão nas Tabelas 3 e 4. Para a amplificação dos genes que foram inseridos no vetor pNPTS138 foi utilizado a polimerase Pfu (Sinapse) e para o *screening* de confirmação de mutante foi utilizado

a reação de mastermix 2x PCR SuperMix (GeneDirex). As PCR foram feitas em um termociclador Bio Rad modelo T100, os ciclos de amplificação podem ser vistos na Tabela 5 e 6 para os genes *zapB* e *zapA*, respectivamente. A confirmação dos fragmentos foi feita por gel de agarose 0,7%. A visualização e documentação dos géis foram feitas com um transiluminador Azure Biosystems C600 (Figuras 4 e 5). Os fragmentos foram purificados com o kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, código K0691), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos de PCRs purificados foram quantificados em um leitor de microplacas Synergy H1N1 (BioTek). Cada fragmento foi digerido com suas respectivas endonucleases (Tabela 1 e 2). A reação de digestão foi montada na seguinte forma: 500ng de DNA para uma reação de 50  $\mu$ L finais e 1 U de enzima de restrição. As reações foram incubadas em banho-maria 37°C por 2 horas. Em seguida, as enzimas de restrição foram inativadas seguindo a recomendação dos fornecedores.

**Tabela 3** – Reação de PCR com as concentrações dos reagentes para a polimerase Pfu.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade por reação</b>
Água MiliQ autoclavada	Suficiente para completar 50 $\mu$ l finais da reação
Tampão da enzima 10X	Diluído para 1X (5 $\mu$ l)
DNA molde	~20 ng
Primer Forward	1,0 $\mu$ M
Primer Reverse	1,0 $\mu$ M
Mix de dNTPs	100,0 $\mu$ M
DMSO	3% (v/v)
Enzima polimerase Pfu	1,0 U
Volume final	50 $\mu$ l

**Tabela 4** – Reação de PCR com as concentrações dos reagentes para a polimerase PCR SuperMix.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade por reação</b>
Água MiliQ autoclavada	Suficiente para completar 20 µl finais da reação
2X PCR SuperMix	Diluído para 1X (10 µl)
DNA molde	~20 ng
Primer Forward	1,0 µM
Primer Reverse	1,0 µM
DMSO	3% (v/v)
Volume final	20 µl

**Tabela 5** – Ciclo de amplificação dos fragmentos na deleção do gene *zapB*.

<b>Repetições</b>	<b>Etapa</b>	<b>A-B</b>	<b>C-D</b>	<b>A-D</b>
1	Desnaturação inicial	95° 2:30	95° 2:30	95° 2:30
35	Desnaturação	95° 0:30	95° 0:30	95° 0:30
	Hibridização	68° 0:30	68° 0:30	68° 0:30
	Extensão	72° 1:00	72° 1:00	72° 2:00
	Extensão final	72° 5:00	72° 5:00	72° 5:00

**Tabela 6** – Ciclo de amplificação dos fragmentos na deleção do gene *zapA*.

<b>Repetições</b>	<b>Etapa</b>	<b>A-B</b>	<b>C-D</b>	<b>A-D</b>
1	Desnaturação inicial	95° 2:30	95° 2:30	95° 2:30
35	Desnaturação	95° 0:30	95° 0:30	95° 0:30
	Hibridização	55° 0:30	55° 0:30	55° 0:30
	Extensão	72° 0:51	72° 0:51	72° 1:40
	Extensão final	72° 5:00	72° 5:00	72° 5:00

### 6.3.3 Preparo das células quimicamente competentes de *E. coli* DH10B

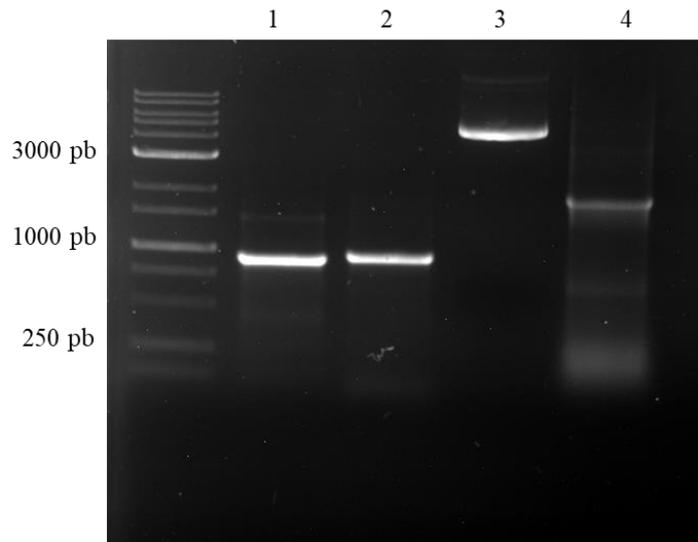
O protocolo seguido para o preparo de células quimicamente competentes seguiu as instruções de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Para o início do procedimento, foi preparado duas soluções, uma de CaCl<sub>2</sub> 0,1M e outra de CaCl<sub>2</sub> 0,1M + 10% glicerol, ambas autoclavadas. A linhagem *E. coli* DH10B foi reativada do -80°C em placa de LB ágar e incubada por 16 horas a 37°C. Após isso, foi feito um pré-inóculo de uma colônia isolado em 5 mL de LB, incubado por 16 horas a 37° com rotação de 200 rpm. Após a incubação, foi transferido 1 mL do pré-inóculo para um Erlenmeyer, previamente autoclavado, contendo 100 mL de meio LB, incubado a 37°C com rotação de 200 rpm até atingir a OD<sub>600nm</sub> 0,4. Em seguida, transferiu o inóculo para 2 tubos de polipropileno (50 mL em cada) e deixados no gelo durante 10 min. Passado o tempo, os tubos foram centrifugados a 4°C por 7 min a 1600 x g. Lembrando que todo o procedimento deve ser feito no gelo. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M, previamente gelado. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 4°C (1100 x g). O sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* ressuspensado novamente em 10 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M e deixado no gelo por 30 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 min a 4°C (1100 x g). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado em 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M + 10% glicerol. Os tubos foram incubados em banho de gelo dentro da geladeira por 16 horas. No dia seguinte, foram feitas alíquotas em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL com 100 µL. Os tubos foram armazenados a -80°C até o momento do uso.

### 6.3.4 Ligação dos fragmentos upstream e downstream dos genes *zapB* e *zapA* no vetor de deleção pNPTS138

A ligação dos fragmentos foi feita no vetor pNPTS138, disponível no estoque do laboratório. A extração do plasmídeo foi feita utilizando o kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, código K0502). Após a extração do DNA plasmidial, ele foi quantificado no leitor Synergy H1N1 (BioTek). Para a inserção dos fragmentos referente a deleção do gene *zapB*, o vetor pNPTS138 foi digerido com as enzimas SpeI e HindIII para a seguinte reação: 500 ng de DNA para uma reação de 50 µL finais e 1 U de enzima de restrição. A reação de digestão foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas. Para a inserção dos fragmentos do gene *zapA*, as enzimas utilizadas foram SpeI e Sall, seguindo a mesma reação utilizada nos passos anteriores. Ambas reações de digestão foram purificadas de gel de agarose 0,7% com o kit GeneJET Gel

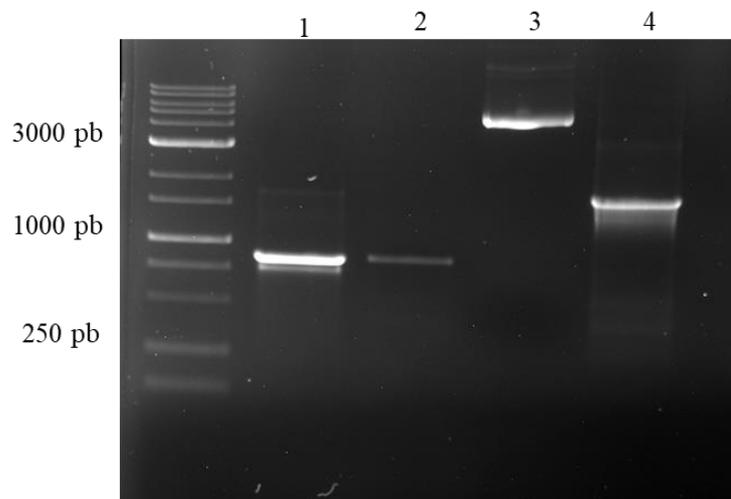
Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, código K0691). Uma vez com os vetores e os fragmentos digeridos, com as respectivas endonucleases, foi montada a reação de ligação. A reação de ligação foi tripla, onde na mesma reação foi adicionado o vetor pNPTS138, fragmento *upstream* e fragmento *downstream*. A reação de ligação foi feita usando a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos das ligações foram transformados em células de *E. coli* quimicamente competentes e o processo de transformação seguiu o protocolo de Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). As alíquotas de células competentes foram descongeladas do -80° em banho de gelo. Após o descongelamento, em um tubo de microcentrifuga de 1.5 mL foi adicionado 10 µl da reação de ligação e depois 100 µl de célula competente, sempre nessa ordem. Os tubos foram incubados no gelo por 30 min e depois foram colocados em banho seco a 42°C por 45 segundos. Em seguida, os tubos foram colocados novamente no gelo e foi adicionado 900 µL de LB, incubado por 1 hora a 37°C (200 rpm). Após a incubação, a suspensão de célula foi plaqueada em 100 µl em placa LB com canamicina (20 µg/mL), IPTG (0,1 mM) e Xgal (0,0032%). O restante do inóculo foi centrifugado por 2 min a 1600 x g. O sobrenadante foi descartado (deixar mais ou menos 100 µL no tubo) e com o resto do sobrenadante foi ressuspendido o *pellet* e plaqueado. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. A confirmação do mutante foi feita selecionando as colônias brancas e por PCR de colônia utilizando os primers A-D como foi descrito anteriormente (Figuras 4 e 5). Os mutantes positivos foram enviados para sequenciamento para a empresa Macrogen.

**Figura 3**– Construção do vetor de deleção pNPTS138 do gene *zapB*; (1) Amplificação do fragmento *upstream* com os primers A-B; (2) Amplificação do fragmento *downstream* com os primers C-D; (3) Extração plasmidial do vetor pNPTS138; (4) Construção positiva pNPTS138 com os fragmentos *upstream* e *downstream* (amplificada com os primers A-D); Marcador de peso molecular 1 kb (KASVI, k9-1000L).



Fonte: imagem obtida com o transiluminador Azure Biosystems C600.

**Figura 4**– Construção do vetor de deleção pNPTS138 do gene *zapA*; (1) Amplificação do fragmento *upstream* com os primers A-B; (2) Amplificação do fragmento *downstream* com os primers C-D; (3) Extração plasmidial do vetor pNPTS138; (4) Construção positiva pNPTS138 com os fragmentos *upstream* e *downstream* (amplificada com os primers A-D); Marcador de peso molecular 1 kb (KASVI, k9-1000L).



Fonte: imagem obtida com o transiluminador Azure Biosystems C600.

### 6.3.5 Preparo de células eletrocompetentes de *X. citri*

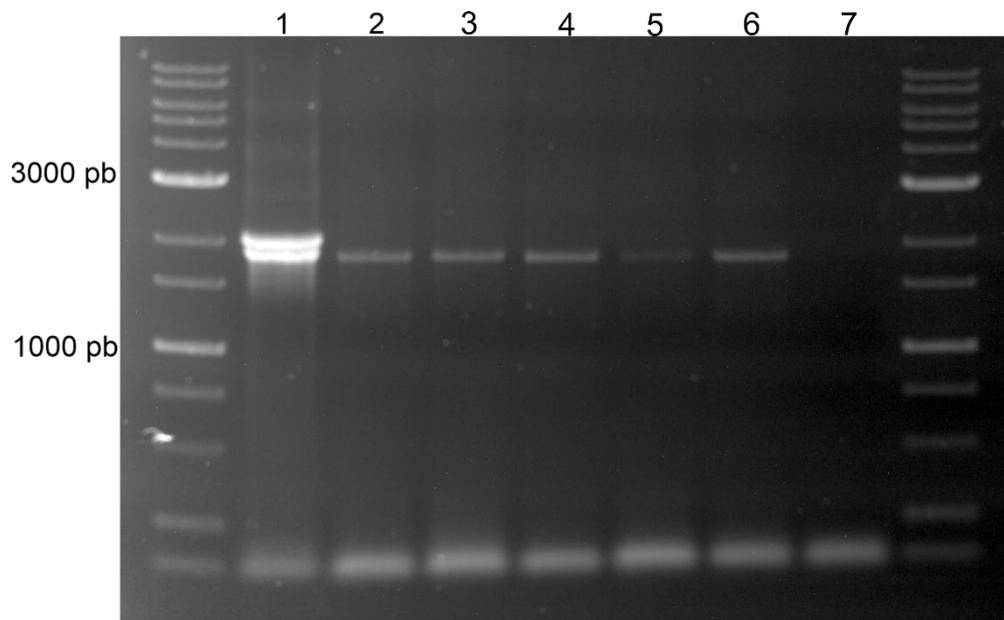
Seguiu-se o protocolo estabelecido por Ferreira e colaboradores (1995) com algumas alterações. Foi reativada a linhagem *X. citri* 306 em NYG ágar a 30°C por 48 horas. Foi feito um inóculo de uma única colônia isolada em 10 mL de NYG, e mantido a 30°C por 16 horas (200 rpm). O inóculo foi transferido para 4 tubos de 2 mL, eles foram centrifugados por 2 min a 4000 x g e 25°C. O sobrenadante foi descartado e ressuscitado com 1 mL de água MiliQ autoclavada, centrifugados por 2 min a 4000 x g e 25°C. Foi feita mais uma lavagem com os mesmos parâmetros. Após isso, o sobrenadante foi descartado e com o resto de líquido que fica nos tubos os *pellets* foram dissolvidos e juntados em um único tubo.

### 6.3.6 Transformação dos vetores de deleção em células eletrocompetentes de *X. citri*

As construções de deleção feitas no vetor pNPTS138 foram transformadas em células eletrocompetentes de *X. citri* seguindo o protocolo estabelecido por Ferreira et al. (1995). Após isso, 100 µL da transformação foi plaqueada em meio NYG ágar com canamicina (20 µg/mL). A confirmação do primeiro evento de recombinação homóloga foi feita por PCR de colônia utilizando os primers A-D (Figura 6, deleção de *zapB*; Figura 7, deleção de *zapA*). A colônia positiva para o primeiro evento de recombinação homóloga tem duas bandas de amplificação (2068 pb e 1846 pb, para a deleção de *zapB*; 2029 pb e 1729 pb, para a deleção de *zapA*). A banda maior é referente à amplificação das sequências no cromossoma da bactéria e a banda menor é do vetor pNPTS138 que foi inserido dentro da bactéria. Após a confirmação do da primeira recombinação, os mutantes foram repicados por estriamento e preservados a -80°C. Foram feitos inóculos dos mutantes da primeira recombinação em meio NYG a 30°C por 16 horas (200 rpm) para que ocorresse o segundo evento de recombinação homóloga e expulsão do vetor de deleção. Após a incubação, o inóculo foi diluído para 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> e plaqueado em NYG contendo 10% de sacarose a 30°C por 48 horas. As células que integraram o vetor pNPTS138 serão eliminadas, pois o vetor tem o locus do gene *sacB* de *Bacillus subtilis*, que é letal para Gram-negativa em presença de sacarose (CAI; WOLK; PETER, 1990; BRAMUCCI; NAGARAJAN, 1996). Após o crescimento de colônias isoladas, elas foram repicadas em placas NYG ágar e NYG ágar contendo canamicina (20µg/ml). As colônias que não cresceram na placa com canamicina foram selecionadas e feito PCR de colônia com os primers A-D para confirmação do segundo evento de recombinação. As colônias que tiverem apenas a banda de

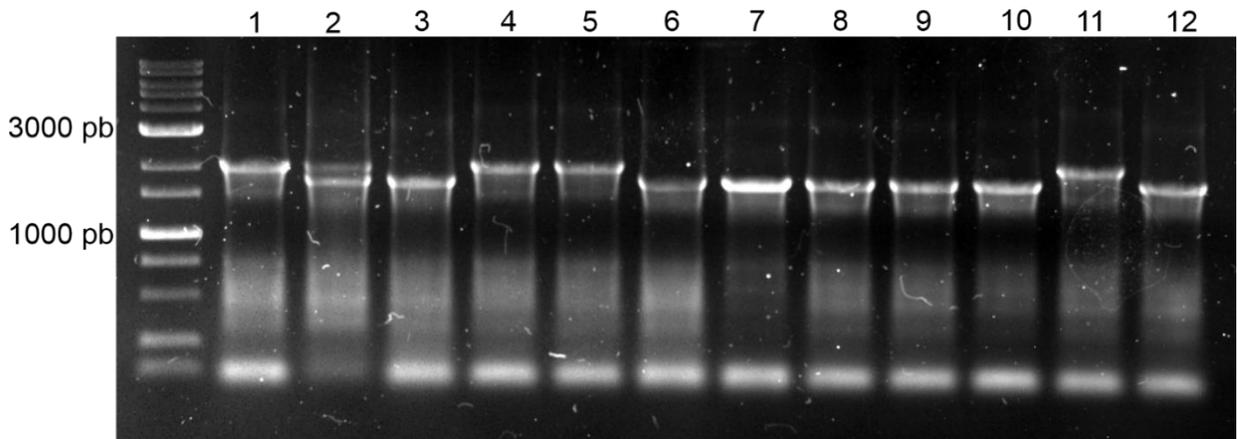
menor peso (1846 para a deleção de *zapB*; 1729 pb para a deleção de *zapA*) da amplificação dos primers A-D é o mutante positivo para a deleção. Portanto, foi obtido 5 mutantes para a deleção do gene *zapB* e 7 mutantes positivos para a deleção de *zapA*.

**Figura 5** – Gel de agarose com os produtos de PCR para a confirmação da deleção do gene *zapB*; PCR de colônia utilizando os primers A e D para a deleção de *zapB*; (1) PCR do primeiro recombinante mostrando as duas bandas de amplificação 2068 pb e 1846 pb (controle); (2-6) Mutantes positivos para a deleção do gene *zapB* com a amplificação dos fragmentos *upstream* e *downstream* (1846 pb); (7) Controle negativo; Marcador de peso molecular 1 kb (KASVI, 9-1000L).



Fonte: imagem obtida com o transiluminador Azure Biosystems C600.

**Figura 6** – Gel de agarose com os produtos de PCR para a confirmação da deleção do gene *zapA*; PCR de colônia utilizando os primers A e D para a deleção de *zapA*; (1) Amplificação de *X. citri* com os primers A-D; (2) PCR do primeiro recombinante mostrando as duas bandas de amplificação (2029 pb e 1729 pb); (3, 6, 7, 8, 9, 10 e 12) Mutantes positivos para a deleção do gene *zapA* com a amplificação dos fragmentos *upstream* e *downstream* (1729 pb); (4, 5 e 11) Mutantes negativos. Com a amplificação dos fragmentos *upstream*, *downstream* e *zapA* (2029); Marcador de peso molecular 1 kb (KASVI, k9-1000L).



Fonte: imagem obtida com o transiluminador Azure Biosystems C600.

### 6.3.7 Complementação mutantes $\Delta zapB$ e $\Delta zapA$

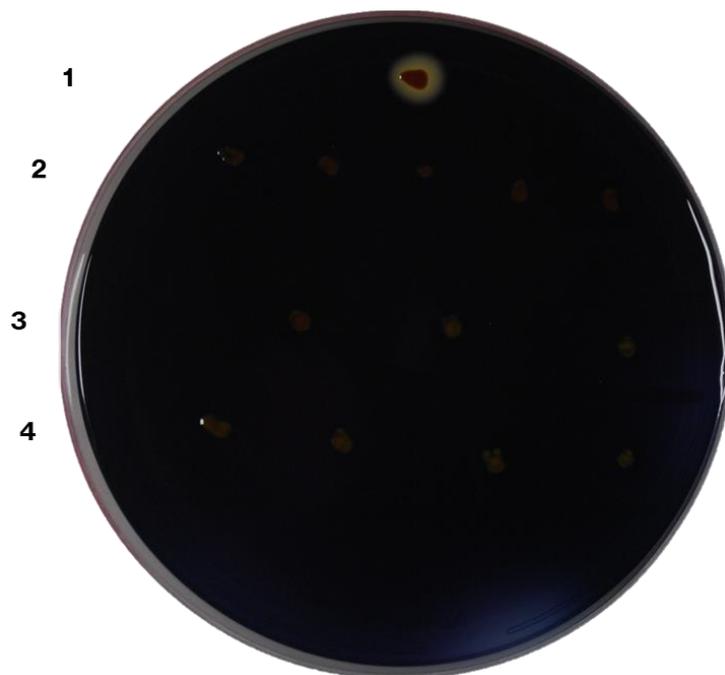
A complementação do mutante  $\Delta zapB$  (Figura 8) foi feita com a integração do vetor pGCD21-GFP-*zapB* (SANTOS *et al.*, 2018) e a complementação do mutante  $\Delta zapA$  (Figura 9) foi com vetor pGCD21-GFP-*zapA* (SANTOS, não publicado). Ambas construções foram feitas em estudos anteriores pelo grupo de pesquisa. A transformação nos mutantes de deleção seguiu o protocolo de Ferreira e colaboradores (1995). A confirmação dos mutantes complementados foi feita por teste de amido, uma vez que o vetor pGCD21 integra no locus da  $\alpha$ -amilase em *X. citri*.

### 6.3.8 Marcação dos genes *zapB* e *zapA* em fusão com proteína fluorescente GFP

Para os estudos de caracterização estrutural do septo de divisão dos mutantes de  $\Delta zapB$  e  $\Delta zapA$  foi utilizada a fusão de ZapA e ZapB com a proteína GFP. Foi integrado no cromossoma do mutante  $\Delta zapB$ , o vetor pGCD21-GFP-*zapA* (SANTOS, não publicado) (Figura 8). Em *X. citri*, a proteína ZapA interage com os protofilamentos de FtsZ, participando na formação do septo

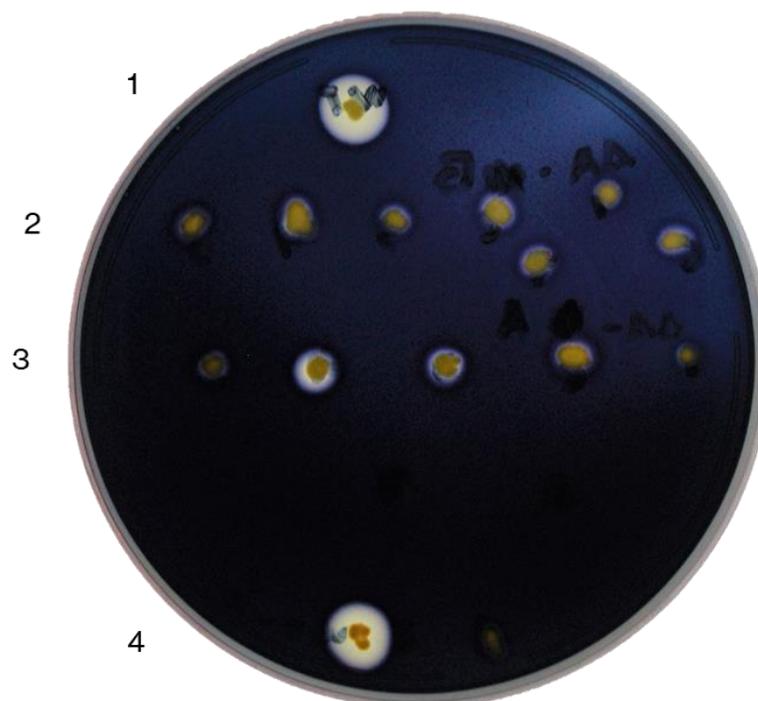
de divisão (MARTINS *et al.*, 2010). Portanto, a expressão da fusão GFP-ZapA permite visualizar o anel-Z nas células. No caso do mutante  $\Delta zapA$ , foi utilizado o vetor pGCD21-GFP-*zapB* (SANTOS, 2018) (Figura 9). A expressão da fusão GFP-ZapB permite investigar se o recrutamento da proteína ZapB para o septo é dependente da proteína ZapA. O processo de transformação com células eletrocompetentes de *X. citri* seguiu o protocolo descrito anteriormente de Ferreira e colaboradores (1995). A confirmação das colônias mutantes foi feita por teste de amido.

**Figura 7** – Teste de amido para confirmar se os vetores pGCD21-GFP-*zapB* e pGCD21-GFP-*zapA* integraram nas células de *X. citri* e *X. citri*  $\Delta zapB$ ; As células foram repicadas em placas NYG contendo amido 0,2% e incubadas por 24 horas a 30°C e reveladas com vapor de iodo. (1) *X. citri* como controle (halo de degradação de amido); (2) Mutantes positivos para *X. citri amy::pGCD21-GFP-zapA*; (3); Mutantes positivos para *X. citri*  $\Delta zapB amy::pGCD21-GFP-zapA$ ; (4) Mutantes positivos para a complementação *X. citri*  $\Delta zapB amy::pGCD21-GFP-zapB$ .



Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa CorelDRAW 2020

**Figura 8** - Teste de amido para confirmar se vetores pGCD21-GFP-*zapB* e pGCD21-GFP-*zapA* integraram nas células de *X. citri* e *X. citri*  $\Delta$ *zapA*; As células foram repicadas em placas NYG contendo amido 0,2% e incubadas por 24 horas a 30°C e reveladas com vapor de iodo; (1) *X. citri* como controle (halo de degradação de amido); (2) Mutante positivos para *X. citri*  $\Delta$ *zapA amy::pGCD21-GFP-zapB*; (3) Mutante positivos para a complementação de *X. citri*  $\Delta$ *zapA amy::pGCD21-GFP-zapA*; (4) Mutante positivos para *X. citri amy::pGCD21-GFP-zapB*.



Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa CorelDRAW 2020

## 6.4 Microscopia

Células foram incubadas com NYG por 16 horas a 30°C (200 rpm). Após o término da incubação, o inóculo foi ajustado para a OD<sub>600nm</sub> de 0,1. Para a expressão das proteínas de fusão (GFP-ZapA e GFP-ZapB) foi adicionado arabinose na concentração final de 0,01%. Quando o inóculo atingiu a OD<sub>600nm</sub> 0,3 foi coletado 500 µL e centrifugado por 2 min a 6000 x g. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com salina (0,85% NaCl) utilizando os mesmos parâmetros de centrifugação. Seguindo-se, foi colocado 5 µL de células em lâminas contendo uma fina camada de agarose 1% em solução salina (NaCl 0,85%) (Martins *et al.*, 2010). Foi utilizado um Microscópio BX-61 Olympus de fluorescência equipado com câmera monocromática OrcaFlash 2.8 (Hamamatsu). A captura e o processamentos das imagens foi realizada com o *software* CellSens Dimension (Olympus).

### 6.5 Curva de crescimento populacional

Células foram incubadas a 30°C por 16 horas (200 rpm). Após o tempo de incubação o inóculo foi ajustado para a OD<sub>600nm</sub> 0,15 e transferido 10 µL de inóculo em placa de 96 poços contendo 200 µl do meio a ser testado. Em seguida, foi incubado a 30°C sob agitação constante e as leituras foram realizadas no leitor de microplacas Synergy H1N1 (BioTek) a cada 30 minutos. As curvas de crescimento foram construídas com o programa Graphpad Prism v. 6.

### 6.6 Testes de patogenicidade – infiltração

O teste de patogenicidade seguiu o protocolo de Martins e colaboradores (2010) com algumas alterações. Os testes foram feitos em plantas de espécie *Citrus sinensis* L. Osbeck. As células foram cultivadas em meio NYG até atingirem a OD<sub>600nm</sub> ~ 0,4. Foi selecionado 3 folhas jovens para o teste de patogenicidade. A suspensão de células foi centrifugada por 5 min a 6000 x g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em salina (NaCl 0,85%) e diluídas 100x. A suspensão foi inoculada nas folhas na superfície abaxial com o auxílio de uma seringa hipodérmica sem a agulha (1 mL). Para o controle negativo foi utilizado salina (NaCl 0,85%). O teste teve uma duração de 30 dias para o surgimento de sintomas.

### 6.7 Teste do amido

O vetor pGCD21 é integrativo em *X. citri* pelo locus do gene da  $\alpha$ -amilase devido a presença do locus *amy* no vetor. Quando o vetor integra no genoma das células por recombinação homóloga impede a produção de amilase. Com isso é possível fazer a seleção de mutantes positivos de *X. citri* observando a ausência de halo na degradação de amido. As células onde o vetor pGCD21 integrou foram plaqueadas em placas de NYG ágar com amido solúvel 0,2% e incubadas a 30°C por 24 horas. Após isso, as placas são expostas em vapor de iodo para a observação da formação do halo de degradação do amido. As fotos das placas foram obtidas pelo programa Camera Control Pro 2 (Nikon).

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

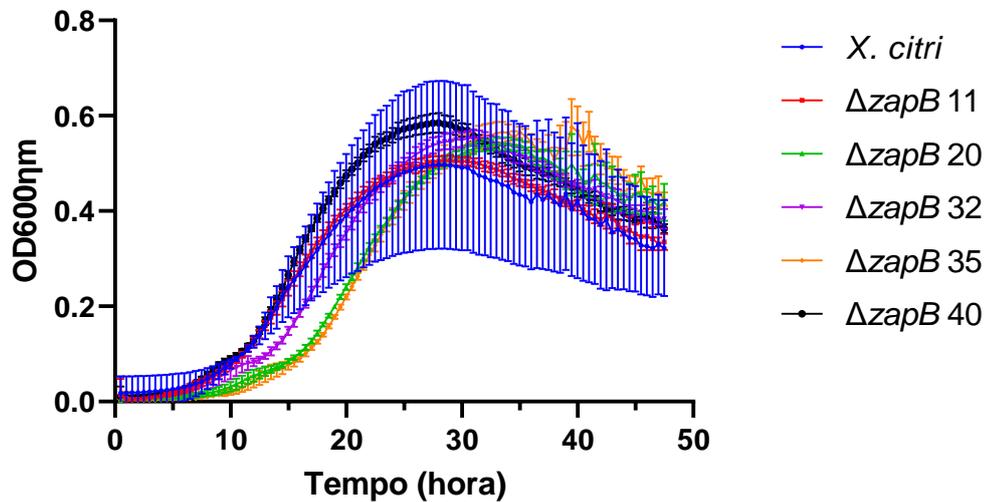
### 7.1 Caracterização do mutante *X. citri* $\Delta zapB$

#### 7.1.1 Curva de crescimento populacional de *X. citri* $\Delta zapB$

Nesse estudo, utilizamos como base o trabalho de Lacerda e colaboradores (2017) para a deleção do gene *zapB* de *X. citri*. O gene foi removido por troca alélica, onde utilizamos um vetor suicida (pNPTS138). Foi obtido um total de 5 mutantes positivos para a deleção de *zapB* (Figura 6). Esses mutantes foram submetidos a uma análise de crescimento populacional para verificar sua *fitness* para avaliarmos se há um padrão de crescimento entre esses mutantes comparado com a cepa selvagem *X. citri*. Os 5 mutantes  $\Delta zapB$ , juntamente com a cepa selvagem *X. citri* (controle), foram cultivados em meio NYG para a construção das curvas de crescimento (Figura 10). Os padrões de crescimento dos mutantes  $\Delta zapB$  foram praticamente iguais ao observado para *X. citri* selvagem, não havendo uma variação significativa entre as curvas. Além disso, os desvios das curvas de crescimento dos mutantes  $\Delta zapB$  e *X. citri* se sobrepuseram indicando que não há diferença entre eles. Esses dados mostraram que não há nenhum mutante fora do padrão de crescimento, sendo assim, selecionamos o primeiro mutante  $\Delta zapB$  (11) para a continuidade dos testes de crescimento populacional e das análises morfológicas.

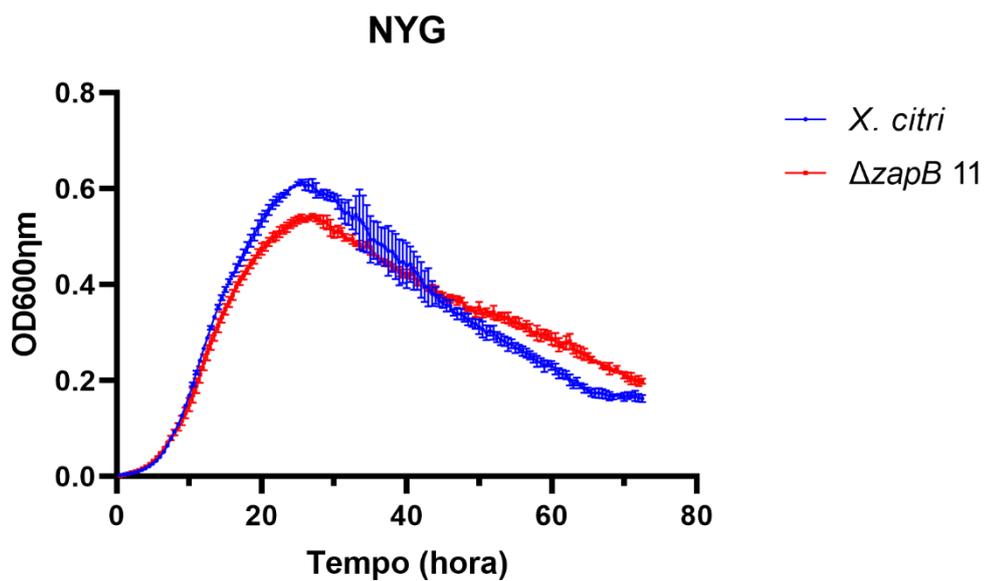
Para os outros testes de crescimento populacional (mutante  $\Delta zapB$  11 e *X. citri*), foram testados os meios complexos NYG (Figura 11), NB (Figura 12), NBY (Figura 13) e um meio mínimo XVM2 (Figura 14). No meio de cultivo NYG, entre 20 e 30 horas o crescimento de *X. citri* alcança a  $OD_{600nm}$  0,6 e o mutante  $\Delta zapB$  11 uma  $OD_{600nm}$  ~0,55, mostrando uma leve diferença de crescimento. A partir de 30 horas, os desvios das duas curvas se sobrepõem indicando que não há mais diferença entre elas. Em relação aos meios NB e NBY não houve uma variação no padrão de crescimento entre o mutante  $\Delta zapB$  11 e *X. citri*. Por outro lado, no meio XVM2 a partir de 30 horas o crescimento do mutante  $\Delta zapB$  11 é menor que o crescimento do controle *X. citri*. Apesar de haver diferença de crescimento em alguns meios em certos pontos, de um modo geral, a ausência da proteína ZapB em *X. citri* não é essencial. O mutante  $\Delta zapB$  11 não é doente a ponto de afetar de forma extrema o seu crescimento. Portanto a proteína ZapB em *X. citri* não é essencial para a viabilidade celular, corroborando com estudos realizados em *E. coli* (EBERSBACH et al., 2008; GALLI; GERDES, 2012).

**Figura 9** – Curva de crescimento populacional de *X. citri* (linha azul) e mutantes  $\Delta zapB$  (demais linhas). Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



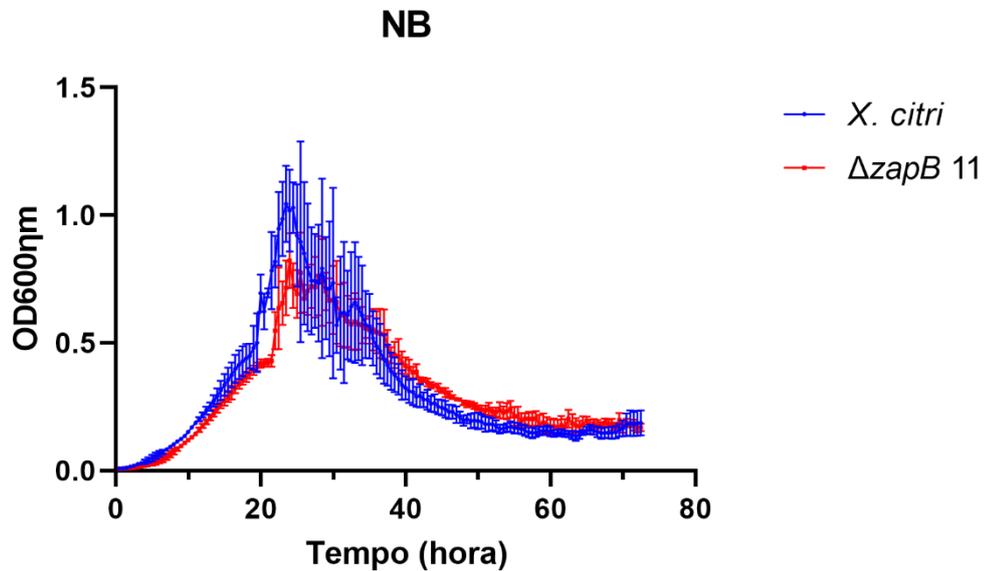
Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

**Figura 10** – Curva de crescimento populacional de mutante  $\Delta zapB$  11 (linha vermelha) e *X. citri* (linha azul) em meio NYG. Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



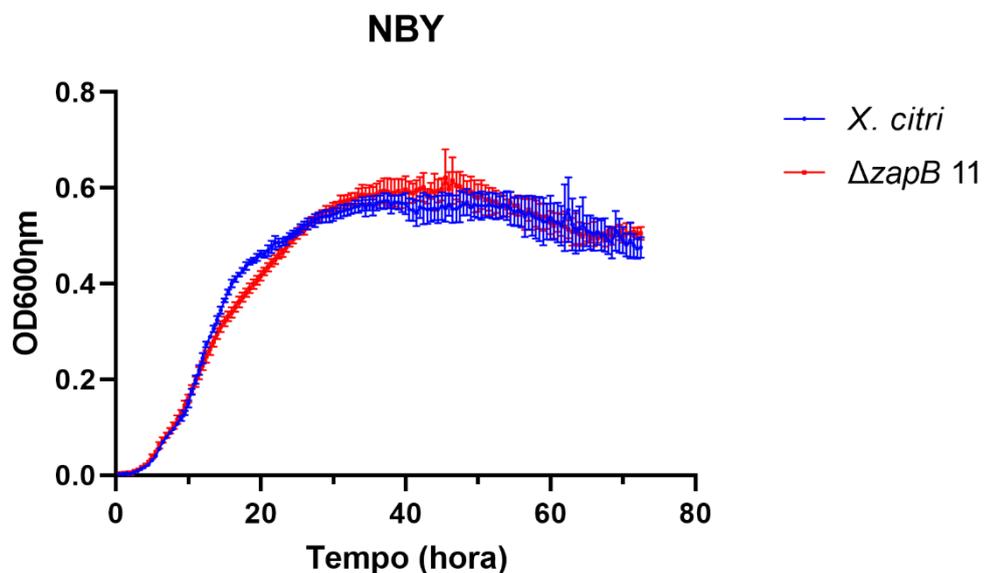
Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

**Figura 11** – Curva de crescimento populacional de mutante  $\Delta zapB$  11 (linha vermelha) e *X. citri* (linha azul) em meio NB. Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



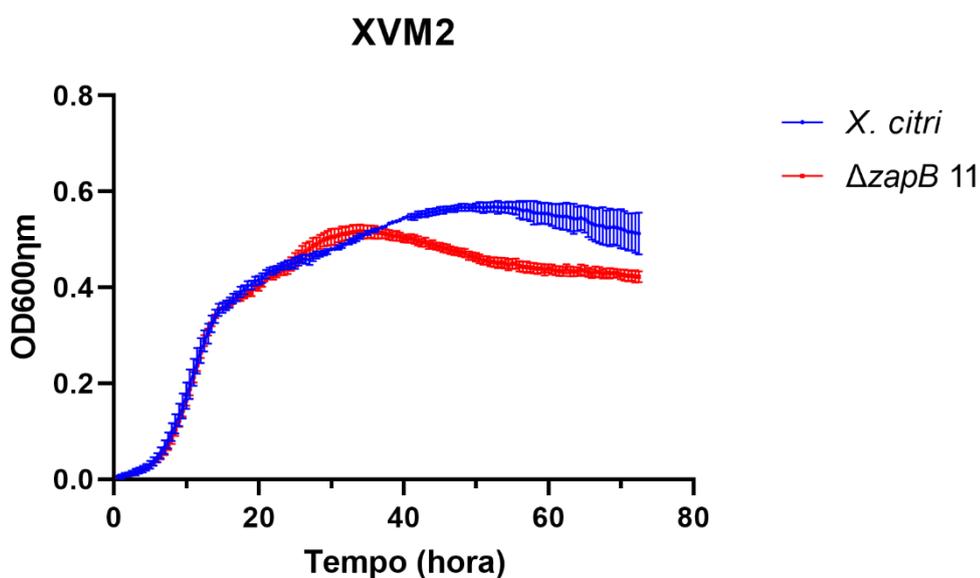
Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

**Figura 12** – Curva de crescimento populacional de mutante  $\Delta zapB$  11 (linha vermelha) e *X. citri* (linha azul) em meio NBY. Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

**Figura 13** – Curva de crescimento populacional de mutante  $\Delta zapB$  11 (linha vermelha) e *X. citri* (linha azul) em meio XVM2. Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



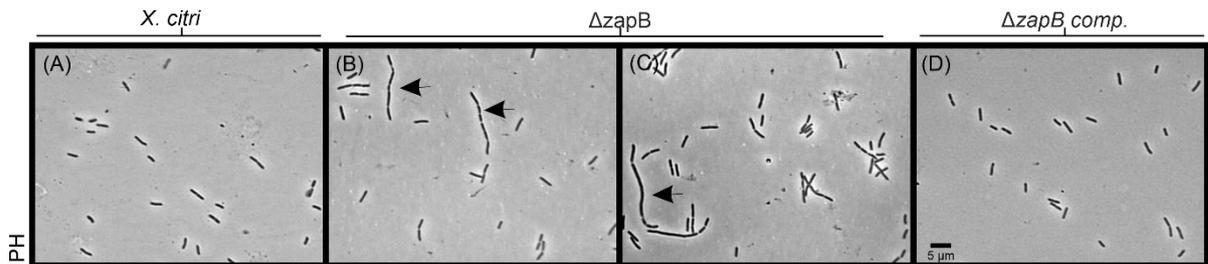
Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

### 7.1.2 Microscopia do mutante *X. citri* $\Delta zapB$

Realizamos análises morfológicas celulares no presente trabalho para investigar se a ausência do gene *zapB* de *X. citri* causaria danos semelhantes. As células de *X. citri* são delgadas e bacilóides como é possível observar na prancha A da Figura 15. A deleção do gene *zapB* provocou a formação de cadeias, filamentos e divisão assimétrica (Figura 15, setas nas pranchas B e C). Observamos ainda um aumento de 16,5% da presença do fenótipo de cadeia entre as células de  $\Delta zapB$  11 (Tabela 7). Além disso, houve variação significativa no comprimento celular entre as células, onde as células de  $\Delta zapB$  11 tiveram uma média de comprimento de  $3,14 \pm 0,66 \mu\text{m}$  e as células de *X. citri* de  $2,37 \pm 0,55 \mu\text{m}$  (Tabela 8). A presença do fenótipo de cadeia pode estar relacionada com erros de segregação cromossômica. Esse erro acontece devido a mecanismos de proteção que existem nas células para proteger o material genético de ser “guilhotinado” pelo sistema de divisão, como a SlmA (BERNHARDT; DE BOER, 2005). Esses dados são interessantes, pois estudos feitos em *E. coli* mostraram que a ausência da proteína apenas aumentou o comprimento celular, não houve a formação de cadeias como

aconteceu nas células de *X. citri* (EBERSBACH et al., 2008). Com isso, a ausência de ZapB em *X. citri* causa o aumento do comprimento celular e formação de cadeia entre as células mutantes.

**Figura 14** – Análise morfológica celular para a ausência da proteína ZapB; Microscopia de contraste de fase (PH); (A) Filtro PH *X. citri* (controle); (B) (C) Filtro PH do mutante  $\Delta zapB$  11, as setas indicam a formação de cadeias nas células do mutante; (D) Filtro PH do mutante  $\Delta zapB$  11 comp.; Ampliação 100x.



Fonte: fotos adquiridas e processadas com o programa CellSens Dimension 11 (Olympus).

**Tabela 7** – Tabela da porcentagem de fenótipos; O experimento foi realizado em triplicada, onde em cada réplica foi contabilizado 200 células (n = 600).

Fenótipo	<i>X. citri</i> 306 (%)	$\Delta zapB$ 11 (%)	$\Delta zapB$ 11 comp. (%)
Normal	99,33±0,76	81,50±6,56	99,33±0,29
Filamento	0,33±0,29	1,67±1,26	0,00±0,00
Cadeia	0,33±0,58	16,83±6,01	0,67±0,29

**Tabela 8** – Tabela das comparações das medidas de comprimentos ( $\mu\text{m}$ ) entre *X. citri*,  $\Delta\text{zapB}$  11 e  $\Delta\text{zapB}$  11 comp.; O experimento foi realizado em triplicada, onde em cada réplica foi contabilizado 200 células ( $n = 600$ )

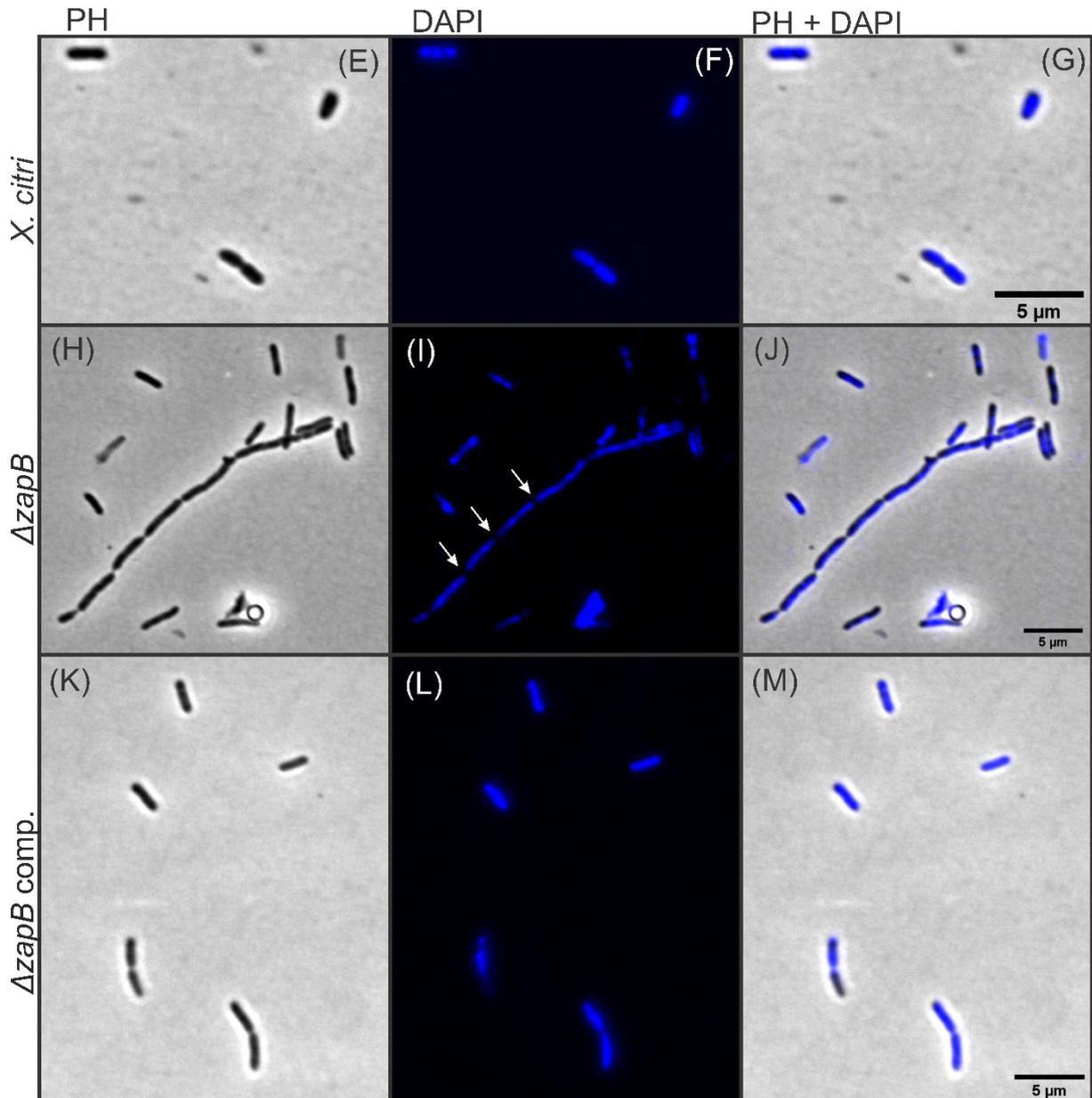
<b>Comparações</b>	<b>Diferença das médias</b>	<b>95,00% CI de diferença</b>	<b>Valor P Ajustado</b>
$\Delta\text{zapB}$ 11 vs. <i>X. citri</i>	0,7699	0,3465 a 1,193	0,0034 **
$\Delta\text{zapB}$ 11 comp. vs. <i>X. citri</i>	0,2075	-0,2160 a 0,6309	0,3541 ns
$\Delta\text{zapB}$ 11 comp. vs. $\Delta\text{zapB}$ 11	-0,5625	-0,9859 a -0,1390	0,0154 *

Os testes de médias foram rodados no programa Graphpad Prism v. 6. ns: não significativo,  $p > 0,05$ ; \*: significativo,  $p < 0,05$ ; \*\*: significativo,  $p < 0,01$ .

### 7.1.3 Microscopia do nucleóide do mutante *X. citri* $\Delta\text{zapB}$

A proteína ZapB está relacionada com o processo de segregação cromossômica. Portanto, a falta de zapB poderia afetar o padrão de segregação cromossômica na célula (DU; LUTKENHAUS, 2019; ESPÉLI, *et al.*, 2012). Para verificarmos esta possibilidade em *X. citri*, realizamos a coloração do nucleóide com DAPI. Na prancha F da Figura 16 é possível observar o nucleóide de células de *X. citri*, onde a segregação está ocorrendo sem erros com o nucleóide ocupando quase todo o espaço celular e mostrando morfologia bilobada característica de células saudáveis. Nas células  $\Delta\text{zapB}$  11 o mesmo está ocorrendo, inclusive nas células com o fenótipo de cadeia (Figura 16, seta na prancha I), corroborando com estudos presentes na literatura (EBERSBACH *et al.*, 2008). Como já foi discutido, o fenótipo de cadeia pode estar relacionado a erros de segregação cromossômica ou comprometimento de passos tardios de divisão celular. Um padrão de continuidade da massa do nucleóide por entre septos de células em cadeia, por exemplo, seria uma indicação de erro de segregação. Porém, nucleóide contínuo não foi observado. Acreditamos assim que os fenótipos de cadeia estejam relacionados com alterações no processo de divisão das células  $\Delta\text{zapB}$  11.

**Figura 15** – Análise do nucleóide para a ausência da proteína ZapB; Microscopia de DAPI; (E) Filtro PH de *X. citri* (controle); (F) Filtro DAPI de *X. citri* (controle); (G) Sobreposição dos filtros PH + DAPI de *X. citri* (controle); (H) Filtro PH de  $\Delta zapB$  11; (I) Filtro DAPI de  $\Delta zapB$  11, as setas indicam o espaço entre os septos em que não é possível observar a massa do nucleóide; (J) Sobreposição dos filtros PH + DAPI de  $\Delta zapB$  11; (K) Filtro PH de  $\Delta zapB$  11 comp.; (L) Filtro DAPI de  $\Delta zapB$  11 comp.; (M) Sobreposição dos filtros PH + DAPI de  $\Delta zapB$  11 comp. Ampliação 100x

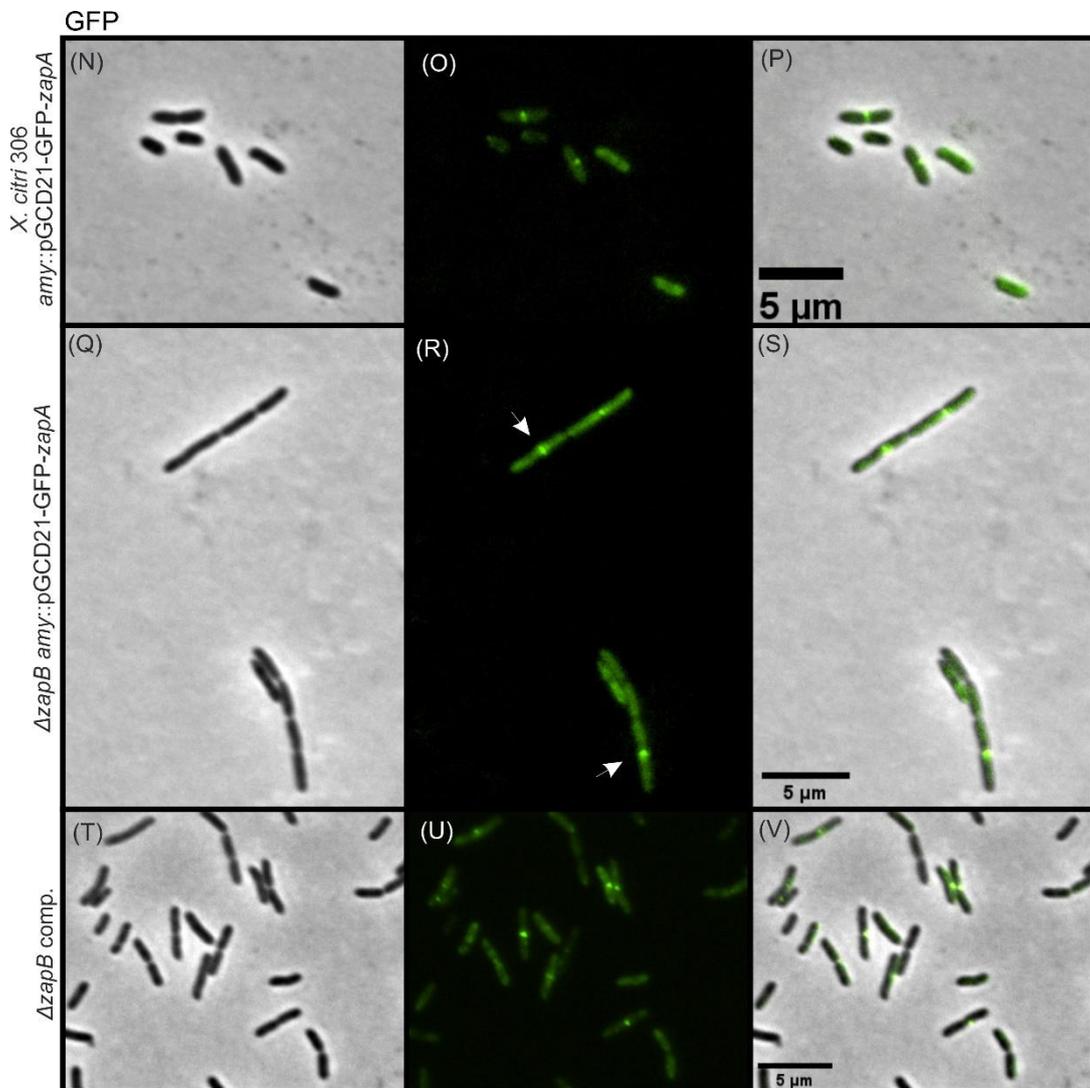


Fonte: fotos adquiridas e processadas com o programa CellSens Dimension 11 (Olympus).

#### 7.1.4 Microscopia do septo de divisão do mutante *X. citri* $\Delta zapB$

A proteína ZapB age como um regulador positivo para a formação do anel-Z. Com isso a falta dela poderia provocar alterações na formação do septo de divisão (DU; LUTKENHAUS, 2019; EBERSBACH et al., 2008). Para investigarmos isto, expressamos o marcador de septo divisional GFP-ZapA no mutante *X. citri*  $\Delta zapB$  11, mediante integração do vetor pGCD21-GFP-*zapA* em seu locus *amy*. Como a proteína ZapA participa da regulação da montagem do anel-Z, GFP-ZapA se liga ao divisomo e produz uma barra perpendicular ao eixo longitudinal das células em divisão (Figura 17, seta na prancha O). Em relação as células do mutante  $\Delta zapB$  11 a expressão da fusão GFP-ZapA permitiu visualizar o mesmo padrão (Figura 17, seta na prancha R). Esses resultados mostram que a ausência da proteína ZapB em *X. citri* não afeta a formação do anel-Z, os quais não corroboraram com os estudos realizados em *E. coli* em que a falta da proteína ZapB provocou a formação de hélices no septo de divisão (EBERSBACH et al., 2008).

**Figura 16** – Análise do septo de divisão para a ausência da proteína ZapB; Microscopia de fluorescência para a expressão da fusão GFP-ZapB e GFP-ZapA.; (N) Filtro PH de *X. citri amy::pGCD21-GFP-zapA* (controle); (O) Filtro GFP de *X. citri amy::pGCD21-GFP-zapA* (controle); (P) Sobreposição dos filtros PH + GFP de *X. citri amy::pGCD21-GFP-zapA* (controle); (Q) Filtro PH de  $\Delta zapB$  11 *amy::pGCD21-GFP-zapA*; (R) Filtro GFP de  $\Delta zapB$  11 *amy::pGCD21-GFP-zapA*, a seta está mostrando o localização do sinal GFP-ZapA no centro celular, indicando que a falta da proteína ZapB não altera a formação do anel-Z; (S) Sobreposição dos filtros PH + GFP de  $\Delta zapB$  11 *amy::pGCD21-GFP-zapA*; (T) Filtro PH de  $\Delta zapB$  11 comp.; (U) Filtro GFP de  $\Delta zapB$  11 comp.; (V) Sobreposição dos filtros PH + GFP de  $\Delta zapB$  11 comp.; Ampliação 100x.



Fonte: fotos adquiridas e processadas com o programa CellSens Dimension 11 (Olympus).

### 7.1.5 Complementação do mutante *X. citri* $\Delta zapB$

Como foi visto anteriormente nesse trabalho, a deleção do gene *zapB* em *X. citri* causa alterações fenotípicas nas células. Portanto, para certificar que as alterações observadas estão sendo realmente causadas pela deleção do gene *zapB* foi feita a complementação do mutante  $\Delta zapB$  11 com o vetor pGCD21-GFP-*zapB* (SANTOS, 2018). A expressão da fusão GFP-ZapB nas células de  $\Delta zapB$  11 comp. reverteu a formação de cadeias (Figura 15, prancha D). Além disto, quando realizamos a contagem de fenótipos, a média da presença de cadeias nas células de  $\Delta zapB$  11 comp. foi de 0,67% (Tabela 7) ficando próxima à porcentagem das células de *X. citri* (0,33%). A média do comprimento celular das células de  $\Delta zapB$  11 comp. foi de  $2,58 \pm 0,46$   $\mu\text{m}$ , a qual não teve diferença significativa se comparado ao comprimento das células de *X. citri* (Tabela 8). Em relação ao nucleóide, não houve alteração nas células de  $\Delta zapB$  11 comp. onde pela coloração de DAPI observou-se que o nucleóide está integro ocupando quase todo o espaço celular e padrão bilobado (Figura 16, prancha L). Como nesse trabalho foi decidido fazer a complementação do mutante  $\Delta zapB$  11 com a fusão GFP-ZapB seria importante visualizar a expressão dessa fusão para verificar se a presença de GFP não altera a atividade de ZapB. As imagens da microscopia do septo com a expressão de GFP-ZapB nas células de  $\Delta zapB$  11 comp. não mostram alteração na formação do anel-Z, onde é possível observar uma barra integra no centro da célula (Figura 17, prancha U). Com isso, é possível afirmar que as alterações provocadas pela perda do gene *zapB* foram devido à falta da proteína ZapB nas células de *X. citri*. Além disso, a fusão GFP-ZapB não altera a atividade da proteína ZapB.

## 7.2 Caracterização do mutante *X. citri* $\Delta zapA$

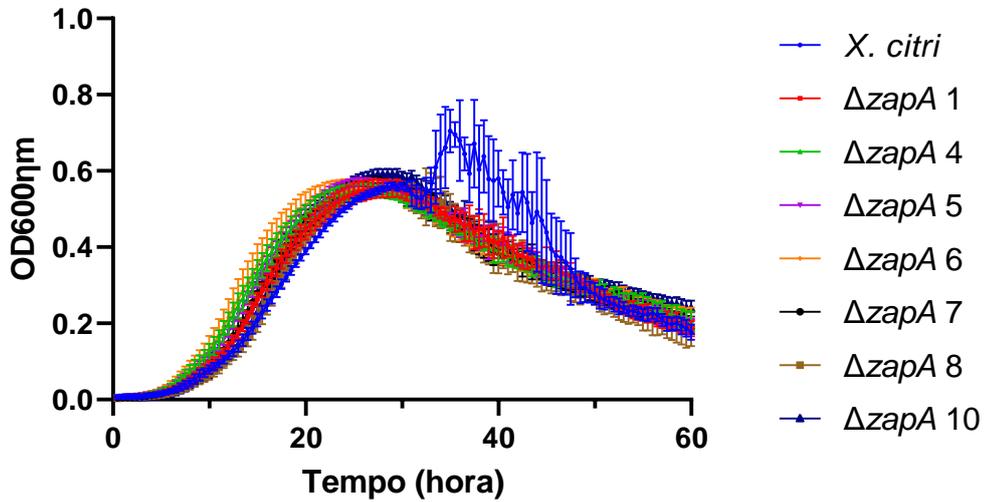
### 7.2.1 Curva de crescimento populacional do mutante *X. citri* $\Delta zapA$

A proteína ZapA participa da regulação de montagem do anel-Z, agindo na estabilização dos protofilamentos de FtsZ. Apesar de desempenhar um papel na divisão celular, estudos realizados em *B. subtilis* e *E. coli* (GALLI; GERDES, 2012; GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002). Para investigarmos se o padrão se repete em *X. citri*, produzimos mutantes de *zapA* nesta bactéria. A deleção do gene *zapA* foi feita por troca alélica como proposto no trabalho de Lacerda e colaboradores (2017), em que foram obtidos 7 mutantes de deleção para *zapA*. Fizemos inicialmente um teste de crescimento populacional em meio NYG para avaliar o *fitness* dos mutantes  $\Delta zapA$  e *X. citri*. Por meio disso, é possível analisar se há um padrão de

crescimento entre os mutantes e caso aja um mutante fora desse padrão de crescimento para ser descartado. Como pode ser visto na Figura 18, os padrões de crescimento entre os mutantes  $\Delta zapA$  foram praticamente iguais, inclusive quando comparados com a curva de crescimento de *X. citri*. Apesar de ter havido um crescimento de *X. citri* a partir de 30 horas de incubação, atingindo uma  $OD_{600nm}$  por volta de 0,7. Os desvios da curva de *X. citri* nesse período de crescimento foram altos, em que em certos pontos se sobrepuseram com os desvios das curvas de crescimentos dos mutantes  $\Delta zapA$ , indicando não haver uma diferença entre eles. Assim, essa análise inicial mostrou não haver uma variação de crescimentos entre os mutantes  $\Delta zapA$  e *X. citri*. Com isso, selecionamos o primeiro mutante de  $\Delta zapA$  (1) para realizar os outros testes de crescimento populacional e análises morfológicas.

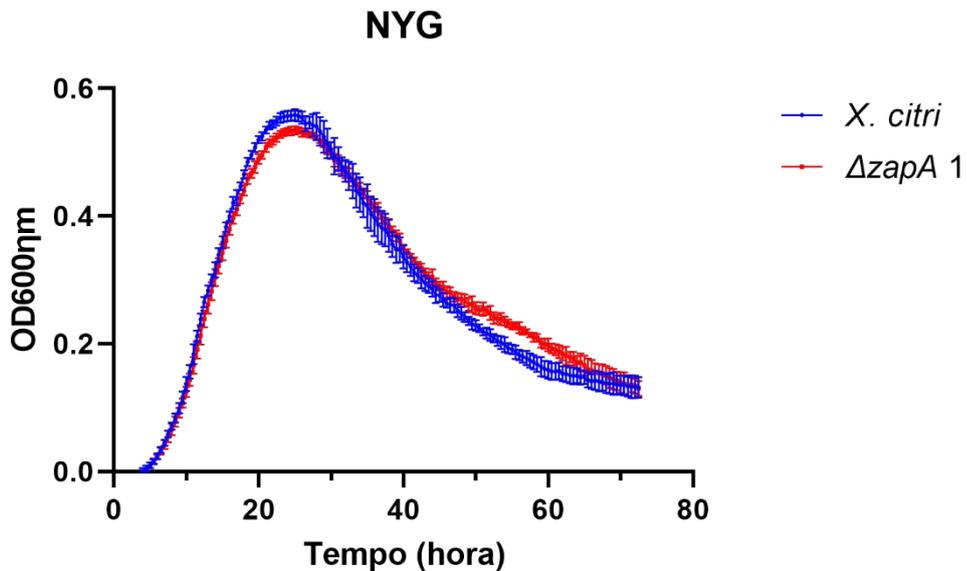
Para os outros testes, foi investigado o crescimento do mutante  $\Delta zapA$  1 nos meios complexos NYG (Figura 19), NB (Figura 20) e NBY (Figura 21), e um meio mínimo XVM2 (Figura 22). De um modo geral, não houve uma variação entre os padrões das curvas de crescimento entre o mutante  $\Delta zapA$  1 e *X. citri* nos meios NYG, NB e XVM2. Em exceção das curvas no meio NBY, em que a partir de 16 horas de incubação houve uma separação entre as curvas, em que a  $OD_{600nm}$  máxima de *X. citri* foi ~0,8 e a de mutante  $\Delta zapA$  1 ~0,75. Esses resultados mostram de um modo geral que a falta da proteína ZapA não compromete o crescimento celular a ponto de ser uma proteína essencial para a viabilidade celular de *X. citri*. Como foi visto em estudos em *B. subtilis* e *E. coli*, em que a proteína ZapA não é essencial nessas células também (GALLI; GERDES, 2012; GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002).

**Figura 17** – Curva de crescimento populacional de *X. citri* (azul) e mutantes  $\Delta zapA$  1 (demais linhas). Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



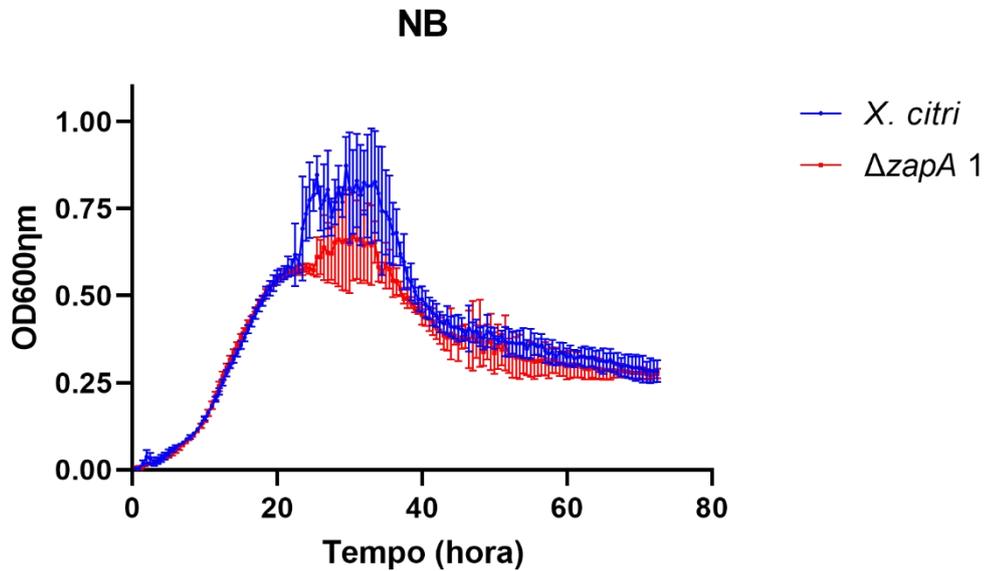
Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

**Figura 18** - Curva de crescimento populacional de mutante  $\Delta zapA$  1 (linha vermelha) e *X. citri* (linha azul) em meio NYG. Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



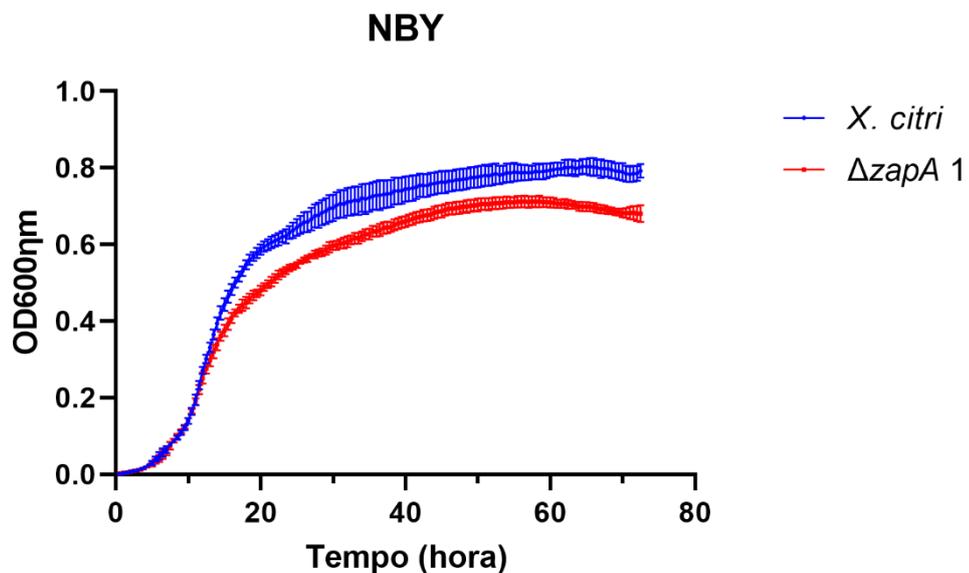
Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

**Figura 19** – Curva de crescimento populacional de mutante  $\Delta zapA$  1 (linha vermelha) e *X. citri* (linha azul) em meio NB. Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



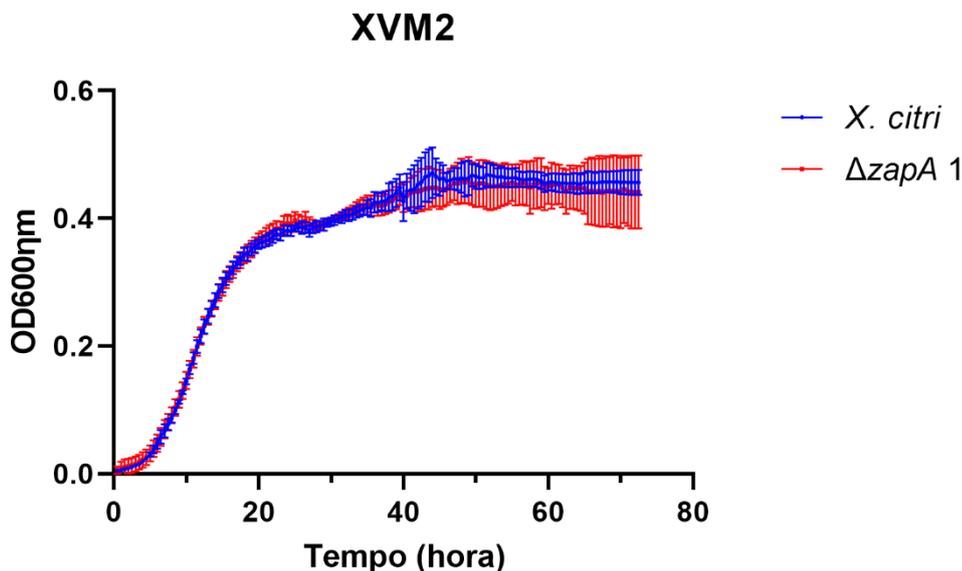
Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

**Figura 20** – Curva de crescimento populacional de mutante  $\Delta zapA$  1 (linha vermelha) e *X. citri* (linha azul) em meio NBY. Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

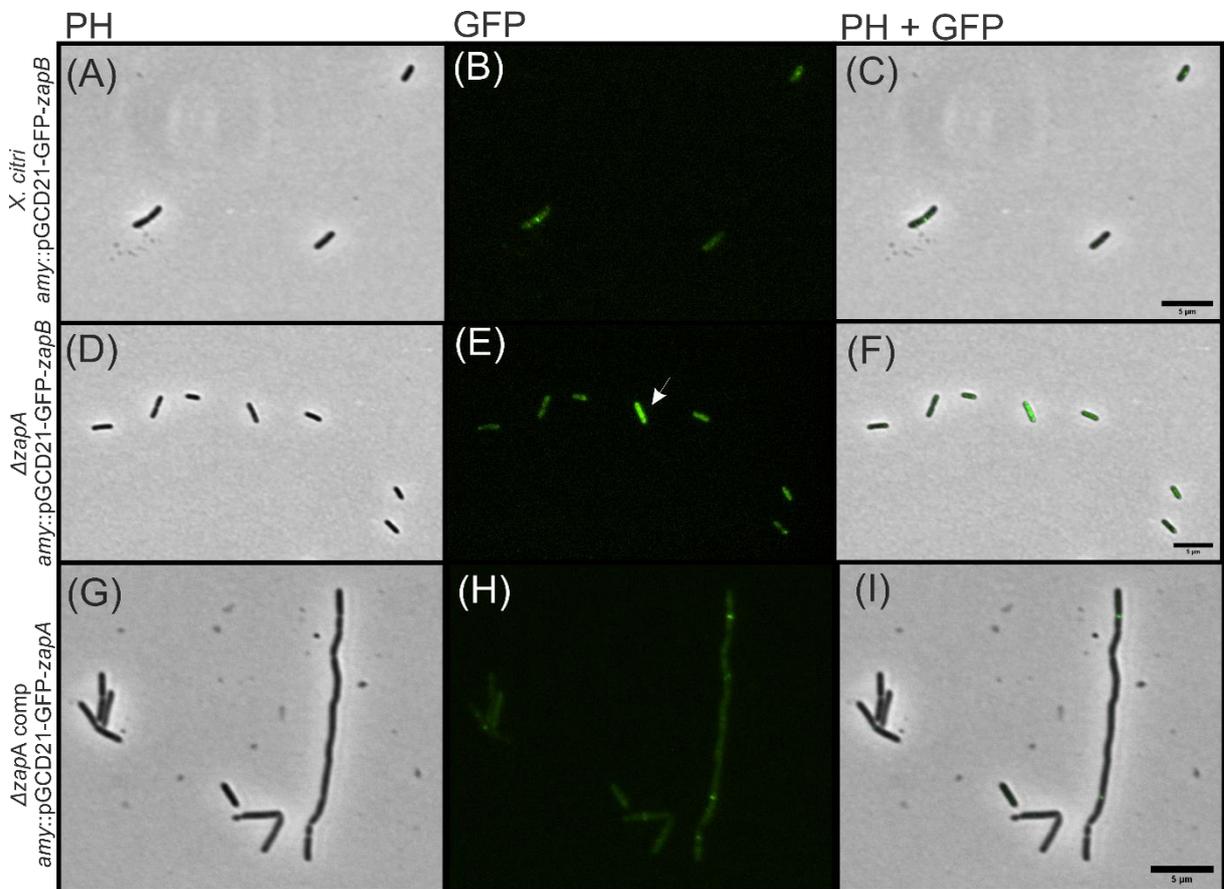
**Figura 21** - Curva de crescimento populacional de mutante  $\Delta zapA$  1 (linha vermelha) e *X. citri* (linha azul) em meio XVM2. Foram feitas 5 réplicas de cada linhagem dentro de um mesmo evento. As curvas foram construídas por média aritmética. As barras são o desvio padrão.



### 7.2.2 Microscopia do mutante *X. citri* $\Delta zapA$

Realizamos análises de morfologia celular para investigar se a falta da proteína ZapA poderia provocar erros no processo de divisão celular em *X. citri*. Como já foi mostrado, as células de *X. citri* são delgadas e bacilóides (Figura 24, prancha A). Ao analisarmos as imagens das células  $\Delta zapA$  1, não foi encontrada alteração no fenótipo celular (Figura 24, prancha D), que indicasse que a ausência do gene estivesse causando erros de divisão celular. Foi verificado o comprimento celular das células de  $\Delta zapA$  1. As análises mostraram que não houve alteração no comprimento celular, onde as células de *X. citri* tiveram uma média de comprimento de  $2,64 \pm 0,48 \mu\text{m}$  e as células de  $\Delta zapA$  1 de  $2,75 \pm 0,45 \mu\text{m}$  (Tabela 9). Sendo assim, a falta da proteína ZapA em *X. citri* não provoca erros característicos de divisão celular, como foi visto na literatura para *B. subtilis* (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002).

**Figura 22** – Análise morfológica do septo de divisão no mutante  $\Delta zapA$  1; Microscopia de fluorescência para a expressão da fusão GFP-ZapB e GFP-ZapA.; (A) Filtro PH de *X. citri amy::pGCD21-GFP-zapB* (controle); (B) Filtro GFP de *X. citri amy::pGCD21-GFP-zapB* (controle); (C) Sobreposição dos filtros PH + GFP de *X. citri amy::pGCD21-GFP-zapB* (controle); (D) Filtro PH de  $\Delta zapA$  1 *amy::pGCD21-GFP-zapB*; (E) Filtro GFP de  $\Delta zapA$  1 *amy::pGCD21-GFP-zapB*, seta indicando que o sinal GFP-ZapB está disperso pelo citoplasma da célula; (F) Sobreposição dos filtros PH + GFP de  $\Delta zapA$  1 *amy::pGCD21-GFP-zapB*; (G) Filtro PH de  $\Delta zapA$  1 comp. *amy::pGCD21-GFP-zapA*; (H) Filtro GFP de  $\Delta zapA$  1 comp. *amy::pGCD21-GFP-zapA*; (I) Sobreposição dos filtros PH + GFP de  $\Delta zapA$  1 comp. *amy::pGCD21-GFP-zapA*; Ampliação 100x.



Fonte: fotos adquiridas e processadas com o programa CellSens Dimension 11 (Olympus).

**Tabela 9** – Tabela das comparações das medidas de comprimentos ( $\mu\text{m}$ ) entre *X. citri* e  $\Delta\text{zapA}$  1; O experimento foi realizado em triplicada, onde em cada réplica foi contabilizado 200 células ( $n = 600$ ).

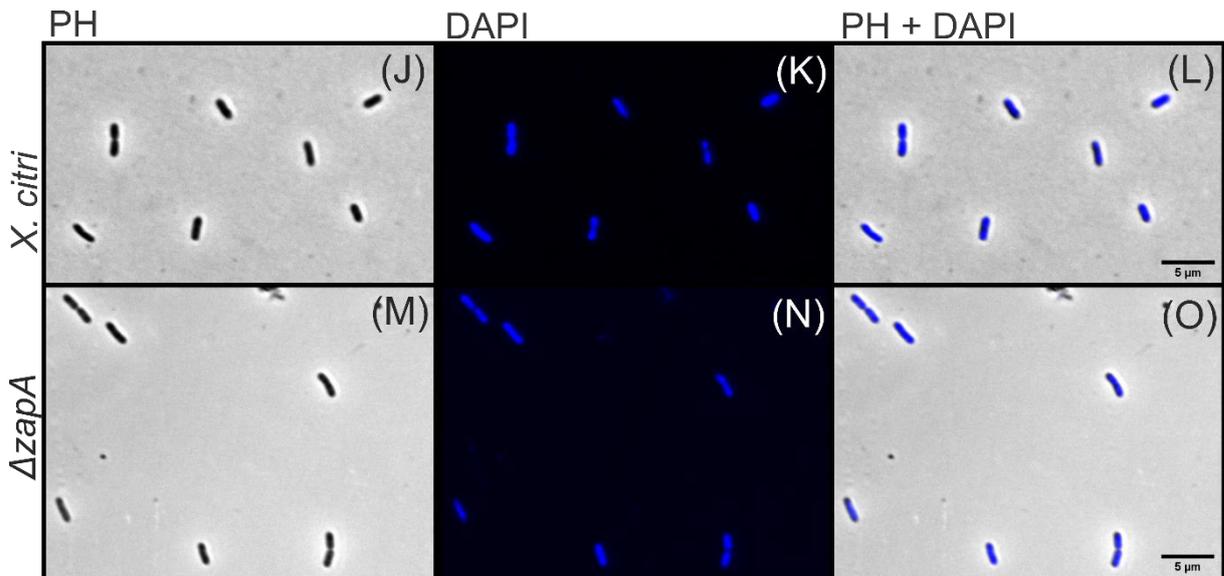
Comparação	Diferença das médias $\pm\text{SEM}$	95,00% CI de diferença	Valor P
$\Delta\text{zapA}$ 1 vs. <i>X. citri</i> 306	$0,1104 \pm 0,09751$	-0,1603 a 0,3811	0,3209 ns

O teste de média foi rodado no programa Graphpad Prism v. 6. ns: não significativo

### 7.2.3 Microscopia do nucleóide do mutante *X. citri* $\Delta\text{zapA}$

A proteína ZapA tem papel no empacotamento dos protofilamentos de FtsZ em bactérias. Entretanto, estudos mostraram que a proteína ZapB poderia funcionar como uma “ponte” entre os processos de divisão celular e segregação cromossômica, por se ligar à proteína ZapA. Com isso, para investigar se a falta da proteína ZapA provoca falha nessa rede entre divisão e segregação, fizemos a coloração de DAPI para a visualização do nucleóide nas células de  $\Delta\text{zapA}$  1 e *X. citri*. Os nucleóides das células de  $\Delta\text{zapA}$  1 não apresentaram nenhum padrão alterado, os quais estão íntegros ocupando quase todo o espaço celular com padrão bilobado (Figura 24, prancha N), como também é possível observar nas células de *X. citri*. Assim, é possível concluir que a ausência da proteína ZapA em *X. citri* parece não interferir com o processo de segregação.

**Figura 23** – Análise do nucleóide para a ausência da proteína ZapA; Microscopia de DAPI; (J) Filtro PH de *X. citri* (controle); (K) Filtro DAPI de *X. citri* (controle); (L) Sobreposição dos filtros PH + DAPI de *X. citri* (controle); (M) Filtro PH de  $\Delta zapA$  1; (N) Filtro DAPI de  $\Delta zapA$  1, como é possível observar o nucleóide das células mutante de  $\Delta zapA$  1 não sofreram alteração, nucleóide com o padrão bilobado, mesmo padrão do controle; (O) Sobreposição dos filtros PH + DAPI de  $\Delta zapA$  1; Ampliação 100x.



Fonte: fotos adquiridas e processadas com o programa CellSens Dimension 11 (Olympus).

#### 7.2.4 Microscopia do septo de divisão do mutante *X. citri* $\Delta zapA$

Estudos anteriores realizados pelo laboratório mostraram que a localização das proteínas ZapA (MARTINS *et al.*, 2010) e ZapB (SANTOS, 2018) estão no centro celular onde ocorre a formação do septo de divisão. Nesse trabalho, foi proposto investigar a co-localização da proteína GFP-ZapB e verificar se o recrutamento dela é dependente de ZapA ou não. Portanto, foi integrado no genoma do mutante  $\Delta zapA$  1 o vetor pGCD21-GFP-*zapB* para determinar a localização da proteína GFP-ZapB. As imagens de microscopia de fluorescência mostraram que a fusão GFP-ZapB fica dispersa pelo espaço celular (Figura 23, seta na prancha E). Quando a fusão GFP-ZapB é expressa em células de *X. citri* é possível observar a localização da proteína GFP-ZapB no septo de divisão (Figura 23, prancha E), a qual forma uma barra perpendicular ao eixo longitudinal da célula. Esses resultados indicam que o recrutamento da proteína ZapB em *X. citri* é dependente da proteína ZapA, como ocorre em células de *E. coli* onde o mesmo padrão foi visualizado (GALLIS; GERDES, 2010).

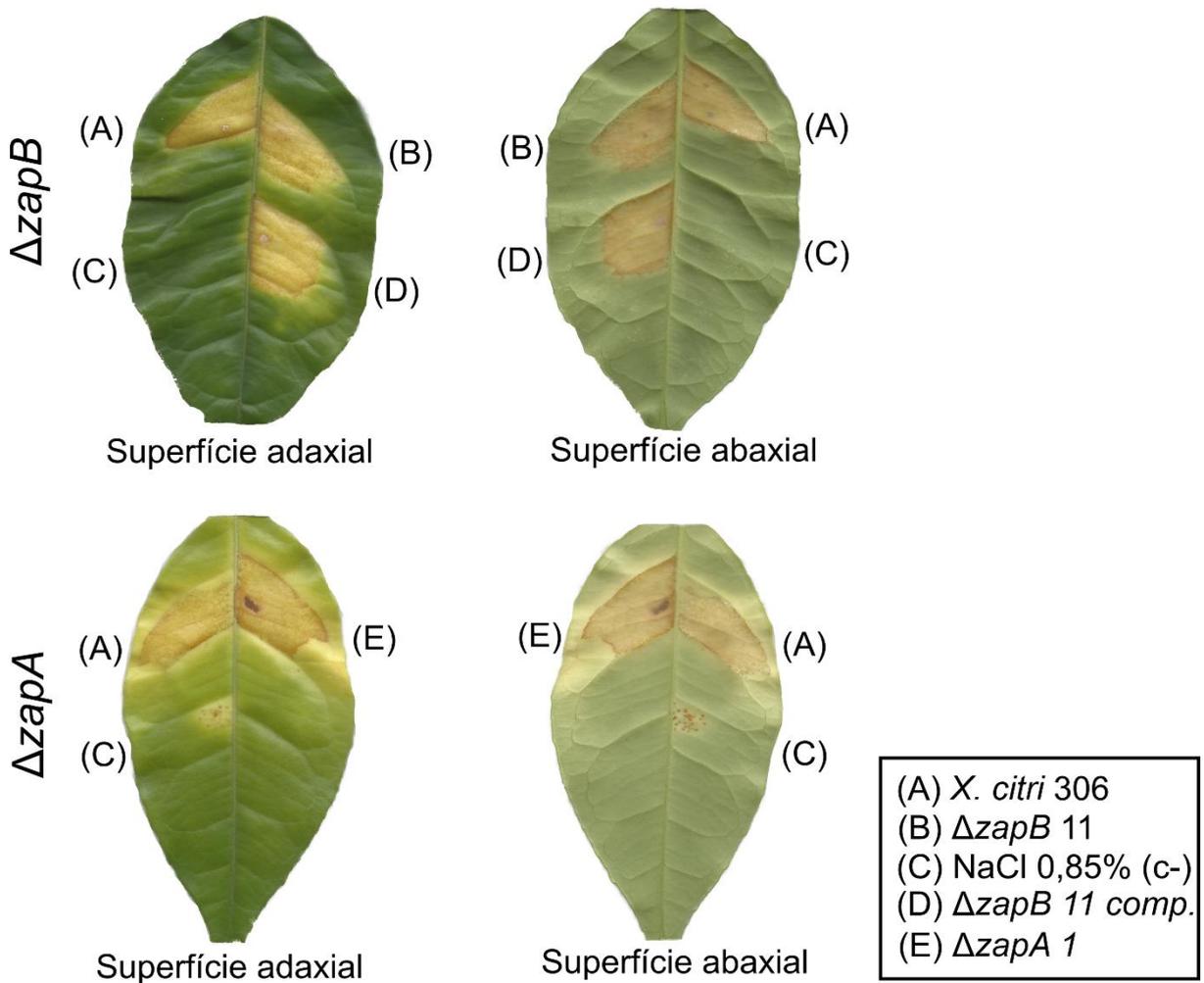
### 7.2.5 Complementação do mutante *X. citri* $\Delta zapA$

A complementação do mutante  $\Delta zapA$  1 foi feita com o vetor pGCD21-GFP-*zapA* o qual foi integrado no locus *amy*. A expressão da fusão GFP-ZapA provocou alterações no fenótipo das células de  $\Delta zapA$  1, em que houve a formação de cadeia e filamentos (Figura 23, prancha G). Apesar dessas alterações, a formação do septo de divisão permaneceu íntegro como é possível observar na prancha H da Figura 23, em que se observa uma barra perpendicular ao eixo longitudinal da célula. Esse resultado mostra que a expressão da fusão GFP-ZapA alterou a atividade da proteína ZapA, prejudicando o funcionamento correto da mesma. Quando a fusão GFP-ZapA é expressa em células de *X. citri*, que apresentam a proteína nativa ZapA, não há a ocorrência de tais erros (Figura 17, prancha O). Sabendo-se que a proteína ZapA opera na forma de dímeros, heterodímeros de ZapA/GFP-ZapA e possivelmente GFP-ZapA/GFP-ZapA não são funcionais. Sendo assim, necessitamos colher dados de uma complementação limpa nas células de  $\Delta zapA$  1, onde estaria sendo expresso somente a proteína ZapA.

## 7.2 Teste de patogenicidade dos mutantes *X. citri* $\Delta zapB$ e *X. citri* $\Delta zapA$

As proteínas ZapA e ZapB participam nos processos de divisão celular e segregação cromossômica. Esses mecanismos garantem a vida, e, por conseguinte, têm papel indireto na infecção por *X. citri*. Para testar tal hipótese, investigamos se os mutantes  $\Delta zapB$  11 e  $\Delta zapA$  1 afetam a patogenicidade das células de *X. citri*. Como é possível observar na Figura 25, o local onde foi infiltrado os inóculos de  $\Delta zapB$  11,  $\Delta zapA$  1 e *X. citri* apresentaram sintomas de cancro cítrico, inclusive para o mutante  $\Delta zapB$  11 comp.. Esses resultados indicam que a falta das proteínas ZapA e ZapB não inviabiliza o processo patogenicidade de *X. citri*. Porém, nesse estudo, não foi realizado a dupla deleção de *zapA* e *zapB* e já foi visto na literatura que a dupla deleção dos genes intensifica a formação de erros de divisão e diminuem a viabilidade celular (GALLI; GERDES 2010).

**Figura 24** – Teste de patogenicidade com as linhagens *X. citri* (controle),  $\Delta zapB$  11,  $\Delta zapB$  11 comp. e  $\Delta zapA$  1. As células foram inoculadas por meio de uma seringa de 1 mL nas folhas de plantas hospedeiras na região abaxial. O experimento durou 30 dias, onde as folhas foram coletadas e escaneadas. (A) sintoma causado pelas células de *X. citri* (controle positivo); (B) sintoma causado pelas células do mutante  $\Delta zapB$  11; (C) salina NaCl 0,85% (controle negativo); (D) sintoma causado pelas células de  $\Delta zapB$  11 comp.; (E) sintoma causado pelas células do mutante  $\Delta zapA$  1.



Fonte: dado da pesquisa

## 8 CONCLUSÃO

A proteína ZapA de *X. citri* está relacionada com o processo de divisão celular. Apesar de fazer parte de um mecanismo essencial e estabilizar o anel-Z essa proteína não é essencial para a viabilidade de *X. citri*. Além de não alterar o crescimento celular, a ausência de *zapA* não provocou erros de divisão celular. Enquanto isso, ZapB faz parte tanto do processo de segregação cromossômica quanto da divisão celular. A ausência de ZapB nas células de *X. citri* provocou erros de divisão celular, em que houve o surgimento de cadeias nas células e aumento do seu comprimento. Apesar disso, não foi visualizado erros de segregação cromossômica. Além disso, foi identificado que a proteína ZapB é dependente da proteína ZapA para ser recrutada para o septo de divisão em *X. citri*. Por último, tanto a ausência da proteína ZapA quanto a ausência da proteína ZapB não interferiram no processo de patogenicidade de *X. citri*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, Alexandre M. do et al. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 292-294, 2005.
- BAILEY, Matthew W. et al. Evidence for divisome localization mechanisms independent of the Min system and SlmA in *Escherichia coli*. **PLoS Genet**, v. 10, n. 8, p. e1004504, 2014.
- BEHLAU, Franklin et al. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja'Pêra Rio'sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 311-317, 2007.
- BEHLAU, Franklin et al. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. citri and *Xanthomonas alfalfae* subsp. citrumelonis. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4089-4096, 2011.
- BEHLAU, F.; FONSECA, A. E.; BELASQUE JR, J. A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in São Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009. **Plant Pathology**, v. 65, n. 8, p. 1390-1399, 2016.
- BEHLAU, Franklin. An overview of citrus canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, p. 1-12, 2020.
- BEHLAU, Franklin; GOCHEZ, Alberto M.; JONES, Jeffrey B. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. **Tropical Plant Pathology**, p. 1-13, 2020.
- BELASQUE JR, José; FERNANDES, Nelson Gimenes; MASSARI, Cícero Augusto. O sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 91-92, 2009.
- BELASQUE JUNIOR, José et al. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 314-317, 2010.
- BERMUDES, David; HINKLE, Gregory; MARGULIS, Lynn. Do prokaryotes contain microtubules?. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 387-400, 1994.
- BERNHARDT, Thomas G.; DE BOER, Piet AJ. SlmA, a nucleoid-associated, FtsZ binding protein required for blocking septal ring assembly over chromosomes in *E. coli*. **Molecular cell**, v. 18, n. 5, p. 555-564, 2005.
- BHATTACHARYA, Anusri et al. ZapC promotes assembly and stability of FtsZ filaments by binding at a different site on FtsZ than ZipA. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 435-442, 2015.
- BISSON-FILHO, Alexandre W. et al. Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. **Science**, v. 355, n. 6326, p. 739-743, 2017.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. *O biológico*, São Paulo, v. 23, n. 10, 1957.

- BOCK, C. H.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker-infected citrus trees. **Plant Disease**, v. 89, n. 1, p. 71-80, 2005.
- BRAMUCCI, Michael G.; NAGARAJAN, Vasantha. Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 11, p. 3948-3953, 1996.
- BRUNINGS, Asha M.; GABRIEL, Dean W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular plant pathology**, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.
- BUDELMEIJER, Nienke; BECKWITH, Jon. Assembly of cell division proteins at the *E. coli* cell center. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 6, p. 553-557, 2002.
- BUQUICCHIO, F.; SPRUYT, M. Gene Runner, 2019.
- BUSS, Jackson et al. A multi-layered protein network stabilizes the *Escherichia coli* FtsZ-ring and modulates constriction dynamics. **PLoS Genet**, v. 11, n. 4, p. e1005128, 2015.
- CAI, Y. P.; WOLK, C. PETER. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3138-3145, 1990.
- CARVER, Tim et al. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464-469, 2012.
- CERNADAS, Raul Andres; CAMILLO, Luciana Rodrigues; BENEDETTI, Celso Eduardo. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. **Molecular plant pathology**, v. 9, n. 5, p. 609-631, 2008.
- CHAGAS, Marcone et al. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001.
- CHEN, Joseph C.; BECKWITH, Jon. FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for colocalization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. **Molecular microbiology**, v. 42, n. 2, p. 395-413, 2001.
- DA SILVA, AC Rasera et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-463, 2002.
- DE KIEVIT, Teresa R.; IGLEWSKI, Barbara H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infection and immunity**, v. 68, n. 9, p. 4839-4849, 2000.
- DOMINGUES, Mariane Noronha et al. The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. **Molecular plant pathology**, v. 11, n. 5, p. 663-675, 2010.

- DU, Shishen; LUTKENHAUS, Joe. At the heart of bacterial cytokinesis: The Z ring. **Trends in microbiology**, v. 27, n. 9, p. 781-791, 2019.
- DURAND-HEREDIA, Jorge M. et al. Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 193, n. 6, p. 1405-1413, 2011.
- DURAND-HEREDIA, Jorge et al. Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 12, p. 3189-3198, 2012.
- EBERSBACH, Gitte et al. Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 3, p. 720-735, 2008.
- ERICKSON, Harold P.; ANDERSON, David E.; OSAWA, Masaki. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 74, n. 4, p. 504-528, 2010.
- ERRINGTON, Jeffery; DANIEL, Richard A.; SCHEFFERS, Dirk-Jan. Cytokinesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 52-65, 2003.
- ESPÉLI, Olivier et al. A MatP–divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in E. coli. **The EMBO journal**, v. 31, n. 14, p. 3198-3211, 2012.
- FERREIRA, H. et al. Electrotransformation of three pathovars of Xanthomonas campestris. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 651-655, 1995.
- FUNDECITRUS, Fundo de defesa da Citricultura. **Reestimativa da safra de laranja 2021/21 do Cinturão Citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro – Fechamento em abril/2021**, 2021
- GALLI, Elisa; GERDES, Kenn. Spatial resolution of two bacterial cell division proteins: ZapA recruits ZapB to the inner face of the Z-ring. **Molecular microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1514-1526, 2010.
- GALLI, Elisa; GERDES, Kenn. FtsZ-ZapA-ZapB interactome of Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 292-302, 2012.
- GOTTWALD, Tim R.; GRAHAM, James H.; SCHUBERT, Tim S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 3, n. 1, p. 15, 2002.
- GOTTWALD, Timothy et al. The epidemiological significance of post-packinghouse survival of Xanthomonas citri subsp. citri for dissemination of Asiatic citrus canker via infected fruit. **Crop Protection**, v. 28, n. 6, p. 508-524, 2009.
- GRAHAM, James H. et al. Xanthomonas axonopodis pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

GUEIROS-FILHO, Frederico J.; LOSICK, Richard. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. **Genes & development**, v. 16, n. 19, p. 2544-2556, 2002.

HALE, Cynthia A.; DE BOER, Piet AJ. Direct binding of FtsZ to ZipA, an essential component of the septal ring structure that mediates cell division in *E. coli*. **Cell**, v. 88, n. 2, p. 175-185, 1997.

HALE, Cynthia A.; DE BOER, Piet AJ. Recruitment of zipa to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on ftsz and independent of ftsa. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 1, p. 167-176, 1999.

HU, Zonglin et al. The MinC component of the division site selection system in *Escherichia coli* interacts with FtsZ to prevent polymerization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 14819-14824, 1999.

HU, Zonglin; LUTKENHAUS, Joe. Topological regulation of cell division in *E. coli*: spatiotemporal oscillation of MinD requires stimulation of its ATPase by MinE and phospholipid. **Molecular cell**, v. 7, n. 6, p. 1337-1343, 2001.

IBGE, I. B. de G. e E. Indicadores IBGE - **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**, Rio de Janeiro, [s. n], 2019.

JUNIOR, Mattos et al. D. de et al. Citros: principais informações e recomendações de cultivo. **Boletim técnico**, v. 200, 2005.

KIEFEL, Ben R.; GILSON, Paul R.; BEECH, Peter L. Diverse eukaryotes have retained mitochondrial homologues of the bacterial division protein FtsZ. **Protist**, v. 155, n. 1, p. 105-115, 2004.

LACERDA, Lilian A. et al. Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid**, v. 90, p. 44-52, 2017.

LOCK, Rowena L.; HARRY, Elizabeth J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 4, p. 324-338, 2008.

LORENZONI, André SG et al. *Xanthomonas citri* MinC oscillates from pole to pole to ensure proper cell division and shape. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1352, 2017.

LOW, Harry H.; MONCRIEFFE, Martin C.; LÖWE, Jan. The crystal structure of ZapA and its modulation of FtsZ polymerisation. **Journal of molecular biology**, v. 341, n. 3, p. 839-852, 2004.

LÖWE, Jan; AMOS, Linda A. Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. **Nature**, v. 391, n. 6663, p. 203-206, 1998.

LUTKENHAUS, J. F.; WOLF-WATZ, Hans; DONACHIE, W. D. Organization of genes in the ftsA-envA region of the *Escherichia coli* genetic map and identification of a new fts locus (ftsZ). **Journal of bacteriology**, v. 142, n. 2, p. 615-620, 1980.

LUTKENHAUS, Joe. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 539-562, 2007.

LYU, Shiheng et al. Identification of Appropriate Reference Genes for Normalizing miRNA Expression in Citrus Infected by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Genes**, v. 11, n. 1, p. 17, 2020.

MÄNNIK, Jaana et al. The role of MatP, ZapA and ZapB in chromosomal organization and dynamics in *Escherichia coli*. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 3, p. 1216-1226, 2016.

MARTEYN, Benoit S. et al. ZapE is a novel cell division protein interacting with FtsZ and modulating the Z-ring dynamics. **MBio**, v. 5, n. 2, 2014.

MARTINS, P. M. PAPEL DA PROTEÍNA ZapA NA DIVISÃO CELULAR E PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2013. Universidade Estadual Paulista, 2013.

MARTINS, Paula MM et al. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS microbiology letters**, v. 310, n. 1, p. 76-83, 2010.

NANNINGA, Nanne. Morphogenesis of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 110-129, 1998.

NEVES, M. F. . O Retrato da Citricultura Brasileira. Ribeirão Preto, p 138, 2010

NOGALES, Eva et al. Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. **Nature structural biology**, v. 5, n. 6, p. 451-458, 1998.

OSTERYOUNG, Katherine W.; VIERLING, Elizabeth. Conserved cell and organelle division. **Nature**, v. 376, n. 6540, p. 473-474, 1995.

PICHOFF, Sebastien; LUTKENHAUS, Joe. Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. **The EMBO journal**, v. 21, n. 4, p. 685-693, 2002.

RASKIN, David M.; DE BOER, Piet AJ. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 9, p. 4971-4976, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. ed. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SANTOS, B.. Caracterização funcional da ORF hipotética XAC3407 codificada por *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2018. 41 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2018.

SCHAAD, Norman W. et al. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom.

rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and ... **Systematic and applied microbiology**, v. 28, n. 6, p. 494-518, 2005.

SCHAAD, Norman W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Papers in Plant Pathology**, p. 96, 2006.

SCHUBERT, Tim S. et al. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida—again. **Plant disease**, v. 85, n. 4, p. 340-356, 2001.

SCHUMACHER, Maria A. et al. Structural and functional analyses reveal insights into the molecular properties of the *Escherichia coli* Z ring stabilizing protein, ZapC. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 5, p. 2485-2498, 2016.

SCHUMACHER, Maria A. et al. Structure of the Z ring-associated protein, ZapD, bound to the C-terminal domain of the tubulin-like protein, FtsZ, suggests mechanism of Z ring stabilization through FtsZ cross-linking. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 9, p. 3740-3750, 2017.

SIEVERS, Jörg et al. Characterization of the parB-like *yaaA* gene of *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1102-1111, 2002.

SMALL, Elaine et al. FtsZ polymer-bundling by the *Escherichia coli* ZapA orthologue, YgfE, involves a conformational change in bound GTP. **Journal of molecular biology**, v. 369, n. 1, p. 210-221, 2007.

SWARUP, Sanjay et al. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Mol Plant Microbe Interact**, v. 5, n. 3, p. 204-213, 1992.

UCCI, Amanda P. et al. Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 1, p. 29-41, 2014.

USDA, United States Department of Agriculture. **Citrus: World Markets and trade**, p. 1-13, 2021

VICENTE, Miguel et al. Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 1, p. 19-27, 2006.

WANG, Xunde; LUTKENHAUS, Joe. FtsZ ring: the eubacterial division apparatus conserved in archaeobacteria. **Molecular microbiology**, v. 21, n. 2, p. 313-320, 1996.

WENGELNIK, Kai; VAN DEN ACKERVEKEN, Guido; BONAS, Ulla. HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 9, p. 704-712, 1996.

WOLDRINGH, C. L. et al. Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. **Research in microbiology**, v. 142, n. 2-3, p. 309-320, 1991.

WU, Ling Juan; ERRINGTON, Jeff. Coordination of cell division and chromosome segregation by a nucleoid occlusion protein in *Bacillus subtilis*. **Cell**, v. 117, n. 7, p. 915-925, 2004.

YOSHIDA, Yamato et al. The bacterial ZapA-like protein ZED is required for mitochondrial division. **Current Biology**, v. 19, n. 17, p. 1491-1497, 2009.

## APÊNDICE A – PRIMERS

Tabela dos primers utilizados neste trabalho

Produto	Primer	Sequência 5' – 3'	Amplicon (pb)		
$\Delta zapA$	Fragmento <i>upstream</i> (A-B)	Up_ <i>zapAF</i> (F) (A)	AAA <b>ACTAGTGCCTTC</b>	852	
		Up_ <i>zapAR</i> (R) (B)	TTCGCTCAGCGCCGG GATGGCAGTGCGAA TTCCAC <b>CCATGGTCA</b> CGTGTGCTGCTC		
	Fragmento <i>downstream</i> (B-C)	Down_ <i>zapAF</i> (F) (C)	AA <b>CCATGGGTGGA</b> ATTCGCACTG		877
		Down_ <i>zapAR</i> (R) (D)	TTT <b>GTCGACCGCGCC</b> CATCCAGTACCG		
$\Delta zapB$	Fragmento <i>upstream</i> (A-B)	3407 UpF (F) (A)	AAA <b>ACTAGTAAGAT</b> CAGAATCGCCTGCTC GCTGCTCCAATGACT	905	
		3407 UpR (R) (B)	<b>AGATCTGCGCTCACG</b> ATAGGGG		
	Fragmento <i>downstream</i> (B-C)	3407 DownF (F) (C)	CCCCTATCGTGAGCG <b>CAGATCTAGTCATTG</b> GAGCAGCACACG	941	
		3407 DownR (R) (D)	AAA <b>AGCTTAATCG</b> GTGTCGCATTGTC		

## APÊNDICE B – LINHAGENS E PLASMÍDEOS

Quadro com os plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Principais características	Referência
pGCD21	Derivado de pHF5Ca (Ucci <i>et al.</i> , 2014), <i>araC</i> , <i>amy</i> , Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	KU678206 (Lorenzoni <i>et al.</i> , 2017).
pNPTS138	vetor de deleção, Km <sup>r</sup> , <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i>	Prof. Lucy Shapiro (Stanford University, USA).

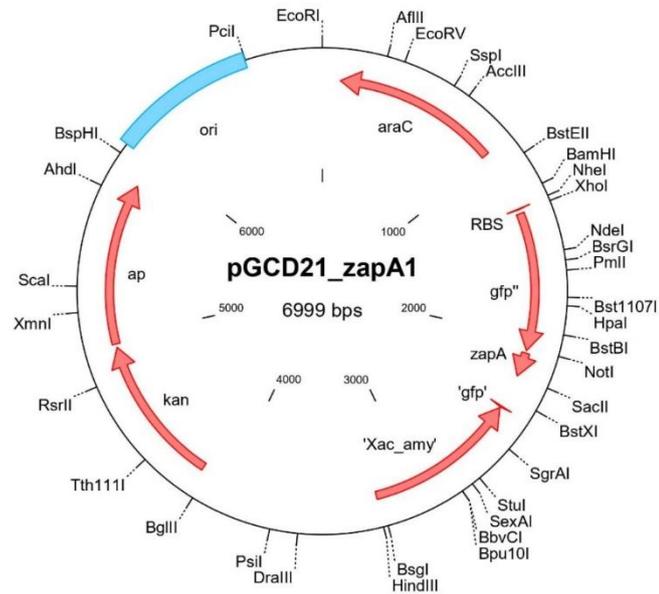
Quadro com as linhagens utilizadas neste trabalho

Apelido	Linhagens	Principais características	Referência
<i>X. citri</i>	<i>X. citri</i> 306	Linhagem 306 de <i>Xanthomonas citri</i> subsp <i>citri</i> ; Ap <sup>R</sup>	SILVA
	<i>X. citri amy::PGCD21-GFP-zapA</i>	Expressa GFP- <i>zapA</i> em <i>amy</i> , Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	(SANTO, não publicado)
	<i>X. citri amy::PGCD21-GFP-zapB</i>	Expressa GFP- <i>zapB</i> em <i>amy</i> , Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(SANTOS., 2018)
	<i>E. coli</i> DH10B	Linhagem utilizada para clonagem	Invitrogen
$\Delta zapA 1$	<i>X. citri</i> $\Delta zapA 1$	Possui deleção para o gene <i>zapA</i> nas coordenadas genômicas 4014887..4015186, Ap <sup>R</sup>	Este trabalho
$\Delta zapB 11$	<i>X. citri</i> $\Delta zapB$	Possui deleção para o gene <i>zapB</i> nas coordenadas genômicas 4014669..4014890, Ap <sup>R</sup>	Este trabalho
$\Delta zapA 1$ comp.	<i>X. citri</i> $\Delta zapA 1 amy::PGCD21-GFP-zapA$	Expressa GFP-ZapA em <i>amy</i> , Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Este trabalho

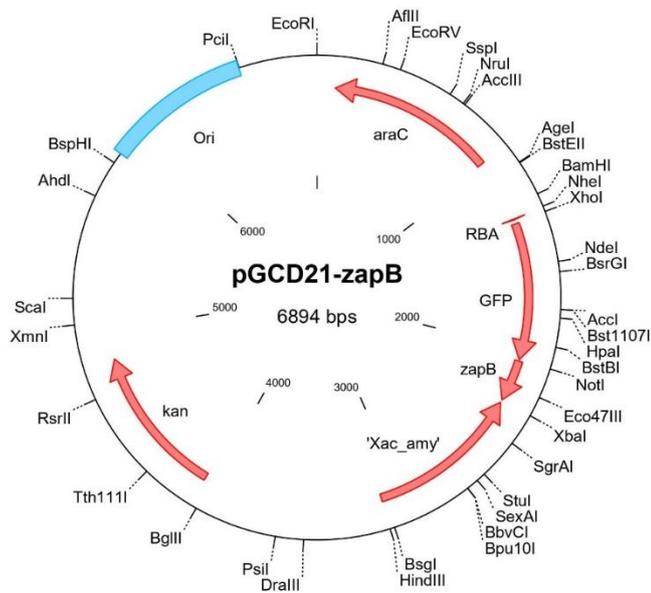
	<i>X. citri</i> $\Delta zapA$ 1 <i>amy::PGCD21-GFP-zapB</i>	Expressa GFP-ZapB em <i>amy</i> , Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Este trabalho
$\Delta zapB$ 11 comp.	<i>X. citri</i> $\Delta zapB$ 11 <i>amy::PGCD21-GFP-zapB</i>	Expressa GFP-ZapB em <i>amy</i> , Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Este trabalho
	<i>X. citri</i> $\Delta zapB$ 11 <i>amy::PGCD21-GFP-zapA</i>	Expressa GFP-ZapA em <i>amy</i> , Ap <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Este trabalho

## APENDICE C – MAPA DE VETOR

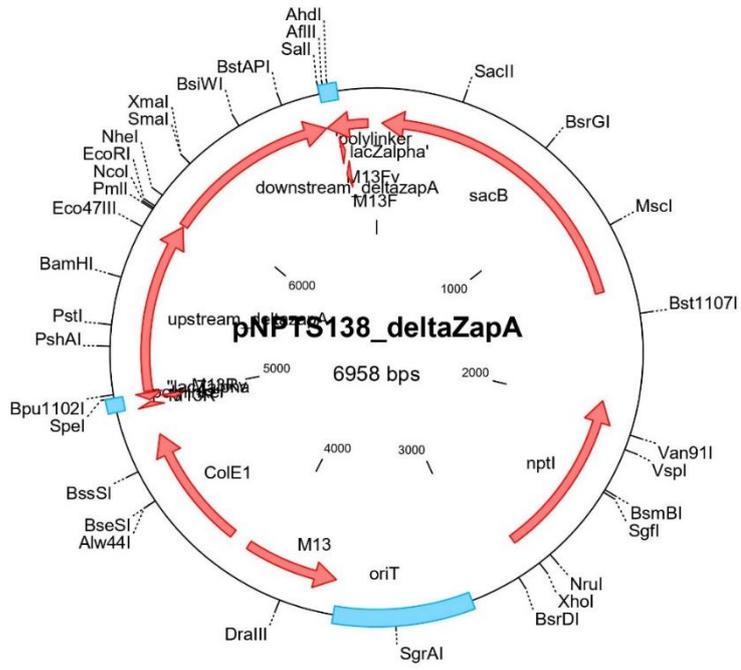
Mapa do vetor pGCD21-GFP-*zapA*



Mapa do vetor pGCD21-*zapB*



Mapa do vetor de deleção  $\Delta zapA$



Mapa do vetor de deleção  $\Delta zapB$

