

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MUTANTE DA ORF  
XAC1008 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac)**

**Angela Rocio Niño Santisteban**

Licenciada em Biologia

**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO MUTANTE DA ORF  
XAC1008 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac)**

**Angela Rocio Niño Santisteban**

**Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

**2015**

S236c Santisteban, Angela Rocio Niño  
Caracterização funcional do mutante da ORF XAC1008 de  
*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) / Angela Rocio Niño Santisteban.  
-- Jaboticabal, 2015  
iv, 64 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015  
Orientador: Jesus Aparecido Ferro  
Banca examinadora: Flavia Maria de Souza Carvalho, Fabrício  
José Jaciani  
Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. Mutagênese. 3. Citrus-patogenicidade.  
. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 632.3:634.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**ÁNGELA ROCÍO NIÑO SANTISTEBAN**, nascida em 20 de março de 1989 na cidade de Bogotá, Colômbia, filha de María Leonor Santisteban Gómez e Antonio Niño Reyes. Concluiu o ensino médio em dezembro de 2004 no Colégio Claretiano na cidade de origem. Em agosto de 2006 iniciou o curso de Licenciatura em Biologia pela Universidade Pedagógica Nacional – UPN na Colômbia, obtendo o título de Licenciada em Biologia em agosto de 2011. Realizou seu TCC em “Padronização do método de extração de DNA total de Písilidos (*Diaphorina citri*) para o diagnóstico de Huanlongbing-HLB por qPCR” no Laboratório Nacional de Diagnóstico Fitossanitário do Instituto Colombiano Agropecuário – ICA. Foi auxiliar de Laboratório do programa em Engenharia em Agroecologia da Corporação Universitaria Minuto de Dios – UNIMINUTO, de agosto de 2011 a dezembro de 2012. Em março de 2013 iniciou o mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV – UNESP, situada Jaboticabal, SP, como bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## **El mundo**

*Un hombre del pueblo de Neguá, en la costa de Colombia, pudo subir al alto cielo.*

*A la vuelta contó. Dijo que había contemplado desde arriba, la vida humana.*

*Y dijo que somos un mar de fueguitos.*

*-El mundo es eso -reveló- un montón de gente, un mar de fueguitos.*

*Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás.*

*No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tanta pasión que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca se enciende.*

**Eduardo Galeano**

*A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.*

**Mahatma Gandhi**

*Aos meus pais Leonor e Antonio por seu amor e ser o motor da minha vida, aos meus irmãos Liliana e Oscar que sempre acreditam em mim incentivando-me a continuar na luta para conquistar meus sonhos.*

*A minha sobrinha Verônica que desde antes de vir ao mundo amei, que amarei e faz cada dia mais feliz a minha vida.*

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, por ter me aceito como sua orientada, pelos ensinamentos que contribuíram na minha formação pessoal e profissional, e a grande paciência que teve comigo. Levo muito desta experiência, é um orgulho poder trabalhar com um verdadeiro cientista.

Ao prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira pela ajuda e paciência durante este processo.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – FCAV – UNESP pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de aluna regular a mim concedida.

Ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – CREBIO, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP, pelo uso dos equipamentos e pela realização dos sequenciamentos.

Aos meus familiares que confiam em mim, no meu trabalho e me apoiam incondicionalmente.

Aos professores, colegas e funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, bem como do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO).

Aos Drs. Rafael Marini e Maria Lucília Machado, pela ajuda e ensinamentos no desenvolvimento deste projeto.

À Dra. Agda Fanciani por todos os ensinamentos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Sou muito grata por ter conhecido uma pessoa tão íntegra como ela.

À Raquel Lunedo, que foi companheira e amiga, com quem as conversas durante o trabalho na bancada fez mais agradável e menos tenso as angústias, problemas e desafios deste projeto.

À Aline Lopes, que foi companheira de angústias e avanços durante a produção de nossos escritos, o que resultou em amizade e apoio fundamental para finalizar esta fase.

À equipe do LBM, com quem convivi durante os últimos dois anos: Flávia, Juliana, Ana Carolina, Tamires, Julie, Aline Belesini, Bruna, Flavinha, Claudênia, Thaísa, Amanda, Jéssica e Mariza.

À Dra. Helen Penha que foi e espero que continue sendo amiga, confidente, companheira e uma profissional que deu uma ajuda importantíssima para o desenvolvimento deste trabalho, além de me dar motivação para não desistir nos piores momentos.

Ao Doutorando Fernando Rodas Mendoza, um excelente profissional, uma pessoa correta, íntegra, que foi professor, orientador, amigo, colega e quase um pai. Sem ele meu avanço não teria sido possível.

Aos meus compatriotas e amigos Elwi, Edwin, Jefferson, Alejandra Carolina, Yeini Colômbia e Liz pela ajuda e apoio.

Aos meus grandes amigos Oniel, David, Jeferson, Maicon, Gabriela, David, Jossue, Valeria e Liliam, que me adotaram na colônia peruana, que felizmente, tive a oportunidade de conhecer durante o decorrer desta caminhada.

Aos Drs. Jorge Evelio Ángel, Edsson Chavarro e Jhon Jairo Monje, que além de chefes depositaram sua confiança em mim e em meu trabalho.

Aos meus amigos de longa data Marcela, Iván, Martha, Yenny, Ana Milena, Diana e Dino, que mesmo desde longe cuidam de mim, me apoiam e são motores em minha vida.

Ao Felipe que me apoia, me motiva a continuar com meus sonhos e com o tempo se converteu em amigo e companheiro, além de namorado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho, o meu sincero agradecimento.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Aspectos gerais dos citros e do cancro cítrico .....	2
2.2 Citricultura no Brasil .....	4
2.3 Ciclo e sintomas do cancro cítrico.....	5
2.4 Manejo e controle do cancro cítrico no Brasil.....	6
2.5 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> (Xac) o agente causal do cancro cítrico.....	8
2.6 Interação planta - patógeno.....	9
2.7 ORF XAC1008 .....	10
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivo geral .....	12
3.2 Objetivos específicos .....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo .....	13
4.2 Vetores e oligonucleotídeos utilizados .....	14
4.3 Mutagênese sitio-dirigida mediante recombinação por homologia.....	15
4.3.1 Mutagênese por deleção da ORF XAC1008.....	15
4.3.2 Clonagem no vetor pGEM®-T-Easy (Promega) .....	18
4.3.3 Obtenção do vetor pOK1 .....	22
4.3.4 Clonagem da construção AD no vetor pOK1 .....	22
4.3.5 Transformação de células eletrocompetentes de Xac 306 .....	24
4.3.6 Seleção de células de Xac contendo a ORF XAC1008 mutada .....	25
4.3.7 Curva de crescimento bacteriano <i>in vitro</i> .....	26
4.3.8 Curva de crescimento bacteriano em limão 'Cravo' ( <i>Citrus limonia</i> Osbeck) .....	26
4.3.9 Teste de patogenicidade em limão 'Cravo' ( <i>Citrus limonia</i> Osbeck) e laranja 'Pêra Rio' ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck) .....	27
4.3.10 Ensaio de formação de biofilme.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1 ANÁLISES <i>in silico</i> DA ORF XAC1008 .....	28

5.2	Mutação sítio-dirigida da ORF XAC1008 .....	32
5.3	Curvas de crescimento e teste de patogenicidade.....	36
5.4	Teste de produção de biofilme .....	40
6.	CONCLUSÃO .....	43
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	43
8.	ANEXOS.....	44
8.1	Clonagem da ORF XAC1008 por meio de clonagem no vetor Champion™ pET SUMO Protein Expression System (Invitrogen).....	44
9.	REFERÊNCIAS .....	46

## CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA HIPOTÉTICA XAC1008 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac)

**RESUMO-** A produção de laranja e de suco concentrado é uma atividade agrícola que tem uma grande importância para o Brasil, em especial para o estado de São Paulo. Entretanto, o cancro cítrico é uma doença que causa grandes prejuízos à citricultura brasileira e mundial, sendo que até o momento não há nenhum método curativo para esta doença e o principal controle é a erradicação das plantas contaminadas. O cancro cítrico é originário da Ásia e tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), a qual ataca todas as espécies comerciais de citros. Em um estudo de expressão gênica em dois mutantes de Xac que apresentavam diminuição ou ausência total de sintomas de cancro cítrico, a proteína XAC1008 se mostrou altamente expressa, pelo que o objetivo deste trabalho foi a caracterização funcional da ORF XAC1008 de Xac. A estratégia utilizada foi a produção de um mutante desta ORF e avaliação da sua patogenicidade quando comparada com a do isolado 306 de Xac selvagem em plantas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbek) e laranja Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). A técnica utilizada para a obtenção do mutante foi a da mutagênese sítio-dirigida por PCR utilizando o vetor suicida pOK1, seguida de recombinação homóloga. Os ensaios de patogenicidade do mutante  $\Delta$ XAC1008 mostraram que a mutação alterou a coloração e o formato das colônias e impediu a multiplicação da bactéria *in planta*, embora ela ainda seja capaz de crescer em meio de cultura. O mutante diminuiu de maneira significativa a formação de biofilme e não foi capaz de causar doença em laranja "Pêra Rio" (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) e em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbek), dois de seus hospedeiros citros, enquanto que a Xac 306 selvagem apresentou os sintomas característicos do cancro cítrico nos dois hospedeiros. Os resultados indicam que a proteína XAC1008 não está diretamente relacionada com a virulência ou patogenicidade da Xac em citros, mas é essencial para a multiplicação e sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Embora a presença do domínio hidrolase\_2 na proteína XAC1008 sugere que a mesma possa estar envolvida em processos de divisão celular, a função exata desta proteína em Xac ainda precisa ser determinada.

**Palavras chave:** cancro cítrico, mutagênese, patogenicidade.

## FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE HYPOTHETICAL PROTEIN XAC1008 OF *Xanthomonas citri* subsp *citri* (Xac).

**Summary-** The production of frozen concentrated juice from sweet orange is an agricultural activity that is of great importance to Brazil, especially for the state of São Paulo. However, citrus canker is a disease that causes bigger losses to the Brazilian and global citrus industry, and to date there is no curative method for this disease and the main control is the eradication of infected plants. The citrus canker originated in Asia and its causal agent is the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), which attacks all commercial species of citrus. In a study of gene expression in two Xac mutants with impaired or total absence of symptoms of citrus canker, the ORF XAC1008 was highly expressed, so the aim of this study was the functional characterization of the protein encoded by ORF XAC1008 from Xac. The strategy used was the construction of a mutant of the ORF XAC XAC1008 and evaluation of its pathogenicity in plants of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbek) and sweet orange “Pêra Rio” (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) compared with the wild isolate strain Xac 306. The technique used for obtaining the mutant was PCR-based site-directed mutagenesis using the suicide vector POK1, followed by homologous recombination. Pathogenicity tests of the mutant  $\Delta$ XAC1008 showed that the mutation affected the color and shape of colonies, and prevent multiplication of bacteria in the plant, though it is still able to grow in the culture medium. The mutant decreased significantly biofilm formation and was not able to cause disease in sweet orange “Pêra Rio” orange and Rangpur lime, two of its citrus hosts, while the wild isolate strain Xac 306 showed the characteristic symptoms of citrus canker in both hosts. The results indicate that the protein XAC1008 is not directly related to the virulence or pathogenicity of Xac in citrus but is essential for the proliferation and survival of the bacteria in the host. Although the presence of the domain hidrolase\_2 in XAC1008 protein suggests that it may be involved in cell division processes, the exact function of this protein in Xac has yet to be determined.

**Keywords:** citrus canker, mutagenesis, pathogenicity.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é, notadamente, um país voltado para o agronegócio, apresentando índices de desenvolvimento agrícola acima da média mundial, e lidera a produtividade do setor na América Latina e Caribe, o que o torna um dos principais fornecedores de alimento no mundo (OECD-FAO, 2015). Dentre os principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil, os de maior destaque são: carnes, produtos florestais, soja, farelo, óleo, café, álcool, açúcar, mandioca, feijão e o suco de laranja. O aumento da produtividade é fomentado mediante os avanços na área da pesquisa e programas do governo que permitem ao produtor proteger-se contra perdas nas safras e com os rebanhos (MAPA, 2015).

As plantas em geral oferecem um reservatório de nutrientes para diferentes microrganismos, que quando a colonizam podem causar doenças com diferentes graus de severidade. Os hospedeiros que causam estas doenças são denominados fitopatógenos.

Um exemplo é *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), a bactéria responsável pelo cancro cítrico, considerado na atualidade como uma das doenças mais agressivas e prejudiciais para a citricultura mundial e do Brasil.

Com o sequenciamento do genoma da Xac (DA SILVA *et al.*, 2002), as informações acerca dos genes desse microrganismo ficaram disponíveis e deu-se então início a diversos estudos moleculares onde a Xac foi adotada como um modelo para o estudo da interação planta-patógeno. A procura por genes envolvidos na patogênese e virulência da Xac no hospedeiro citros vem sendo realizada através de diversas abordagens de genômica funcional tais como proteômica, transcriptômica e mutagênese aleatória. O presente trabalho objetivou realizar a caracterização funcional da proteína codificada pela ORF XAC1008 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) estirpe 306, mediante a deleção de parte desta ORF por mutação sítio-dirigida utilizando o vetor suicida pOK1. O mutante  $\Delta$ XAC1008 foi avaliado quanto à capacidade de causar sintomas de cancro em folhas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e laranja Pêra (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), multiplicação em meio de cultura e *in planta* e produção de biofilme.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais dos citros e do cancro cítrico

A origem dos citros foi descrita como sendo da Ásia oriental (AGUSTÍ, 2004). Na América, os citros foram introduzidos pelos espanhóis e pelos portugueses nos séculos XVI e XVII, que introduziram o gênero na Flórida, México e Brasil. No século XVII os ingleses implantaram sua produção na África do Sul e, no século XVIII, chegaram à Califórnia e à Austrália pelos portugueses. Na atualidade a cultura de citros se estende na maior parte das regiões tropicais e subtropicais, entre os paralelos 44 N e 41 S (HASSE, G., 1987; AGUSTÍ, 2004).

Em relação à classificação botânica e agrônômica, as espécies de citros com interesse comercial, pertencem ao gênero *Citrus*, que faz parte da família Rutaceae, composta por plantas medianas com flores. Além do gênero *Citrus*, fazem parte desta família os gêneros *Poncirus* que possui só uma espécie, sendo esta utilizada como porta enxerto, e o *Fortunella* (Kumquat) que inclui quatro espécies de árvores pequenas e arbustos (AGUSTÍ, 2004). Os citros se caracterizam por serem árvores com altura entre cinco e quinze metros, geralmente com espinhos no talo, flores de cinco pétalas com numerosos estames, e frutos de tamanho e forma diversos (AGUSTÍ, 2004; ICA, 2010).

O produto de maior importância econômica que se obtém dos citros é o suco, principalmente o de laranja, sendo o estado de São Paulo, no Brasil, um dos maiores produtores mundiais de suco de laranja concentrado congelado (SLCC), seguido da Califórnia nos Estados Unidos. As regiões do Mediterrâneo e da Califórnia lideram o mercado em produção de laranja para consumo *in natura*. Outros produtos obtidos a partir de citros são os óleos essenciais, terpenos e farelo de polpa cítrica (NEVES, 2010). Os citros também se caracterizam por seu alto teor de vitamina C, que pode ser considerado como sua principal qualidade (ICA, 2010).

A indústria citrícola tem sido prejudicada por um número variado de pragas, e principalmente patógenos, que atacam os pomares (LARANJEIRA, 2006). Entre as doenças com maior impacto na produção temos: o Huanlongbing - HLB (ou *Greening*) ocasionado pela bactéria *Candidatus liberibacter* spp. e restrita ao floema

(BOVÉ, 2006); e o cancro cítrico que tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), que causa cancrose em ramos, folhas e frutos (NEVES, 2010; POLEK, VIDALAKIS e GODFREY, 2007).

O cancro cítrico, foco do presente estudo, teve origem na Ásia, onde ocorre de forma endêmica em todos os países produtores, sendo a doença relatada em aproximadamente 30 países, principalmente do continente asiático (POLEK, VIDALAKIS E GODFREY, 2007). O primeiro relato no Brasil foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (AMARAL, 1957). Neste mesmo ano, a doença foi encontrada nos Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná. Atualmente, está presente nos Estados de São Paulo, Paraná, Minas de Gerais, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Roraima (BELASQUE, 2005).

Os impactos desta doença estão relacionados à desfolha das plantas, à depreciação da qualidade do produto pela presença de lesões nos frutos, à redução na produção pela queda prematura de frutos e à restrição da comercialização da produção para áreas livres da doença, por representar uma ameaça aos pomares saudáveis, visto que é uma doença quarentenária A2 (COLETTA-FILHO HD, *et al*, 2006; BEHLAU *et al.*, 2008 RODRIGUES NETO; RIBEIRO, 2002).

Como mencionado anteriormente, a bactéria Xac é o agente causal do cancro cítrico. Entretanto, existem outras estirpes que produzem sintomas similares, havendo assim três tipos de cancrose. O tipo A ou cancro asiático, que é ocasionado pela Xac, está amplamente difundido e pode ter como hospedeiros todas as espécies comerciais de citros (Tabela 1). O tipo B e o tipo C são produzidos pelas estirpes *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, tipo B (XauB) e C (XauC), respectivamente. O tipo B foi identificado na Argentina, Paraguai e no Uruguai em espécies de *Citrus limon* (limão), *C. sinensis* (laranja doce) e *C. paradisi* (grapefruit ou toranja). Já o tipo C foi diagnosticado, até o momento, somente em *C. aurantifolia* (Mexican lime ou lima ácida galego) no Brasil (LU H, *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2010).

**Tabela 1.** Classificação segundo o nível de tolerância dos cultivares de citros comerciais que são afetadas pelo cancro cítrico (adaptado de OLIVEIRA; SCIVITTARO; DA ROCHA, 2008).

<b>Nível de tolerância</b>	<b>Variedades</b>
<b>Altamente tolerante</b>	'Calamondin'; 'Kumquat'
<b>Tolerante</b>	Tangerineras satsuma 'Okitsu', satsuma, 'Owari', 'Ponkan', 'Tankan', 'Sun Chu Sha', 'Sunki', 'Cleopatra' e 'Clementina'; laranjas doces 'Folha Murcha' e 'Moro'; lima ácida 'Tahiti'; e laranja 'Azeda'.
<b>Moderadamente tolerante</b>	Tangerinras 'Dancy' e 'Caí' ('Mexerica-do-Rio'); laranjas doces 'Valência' e 'Pêra Premunizada'; e laranja de umbigo 'Navelina'.
<b>Levemente susceptível</b>	Tangerina 'Cravo'; laranja doce 'Natal'; e tangoreiros 'Ortanique' e 'Murcote', limão 'Cravo'
<b>Susceptível</b>	'Laranjas doce Hamlin', 'Seleta Vermelha', 'Ruby', ; Trifoliata; 'Piralima'; laranjas de umbigo 'Bahia' e 'Baianinha'; e tangerina 'Oneco'.
<b>Altamente suscetível</b>	Pomelos, 'Marsh Seedless'; Lima ácida 'Galego'; limão 'Siciliano'; limão 'Kaffir' ; mandarins 'Lee' e 'Fremont'; e tangeleiro 'Orlando'.

## 2.2 Citricultura no Brasil

A citricultura é um setor organizado e competitivo, onde aproximadamente 50% da produção mundial de laranja e 80% da brasileira resultam em sucos industrializados, sendo o Brasil responsável por 60% da produção mundial de suco de laranja concentrado congelado (SLCC) e líder de exportações do produto (MAPA, 2015). Isso foi possível pela conquista do mercado durante os anos 1990 a 1999, e sua consolidação da capacidade e desempenho produtivo, chegando a exportar 98% da produção de suco de laranja no ano de 2009, totalizando 2,15 milhões de toneladas de produtos e US\$ 1,84 bilhão em receita, representando cerca de 3% das exportações do agronegócio brasileiro (NEVES, 2010).

Com 444.583 hectares, a laranja é o citros com maior área plantada no Brasil, seguida por limas ácidas e limões com 27.938 hectares e por tangerinas com 10.070 hectares. As variedades de laranja que mais se destacam no cinturão citrícola são: Hamlin, Westin, Rubi, Valência Americana, Valência Argentina, Seleta, Pineapple, 'Pêra Rio', João Nunes, Valência, Natal e Valência Folha Murcha. Estas variedades representam 97% da área de laranja, sendo os outros 3% pertencem às variedades Bahias, Shamouti, laranjas lima e as limas doces (FUNDECITRUS, 2015b). O plantio



de diferentes variedades garante a produção durante as diferentes épocas de colheita no ano, além de ajudar no controle de doenças e reduzir os impactos das mudanças climáticas (NEVES, 2010).

A estimativa da safra de laranja na região de São Paulo e no triângulo mineiro para o período de 2015 a 2016 são de 278,99 milhões de caixas (40,8 kg), representada principalmente por 96,25 milhões das variedades Valência e Folha Murcha e 72,35 milhões das variedades 'Pêra Rio'. A estimativa foi determinada com base nas árvores produtivas (174,13 milhões), na quantidade de frutos por árvore e na quantidade de laranja necessária para atingir o peso de 40,8 Kg/Caixa, ou seja, frutos por caixa e na taxa de queda (FUNDECITRUS, 2015c).

### 2.3 Ciclo e sintomas do cancro cítrico

De um modo geral, a doença ocorre de forma severa em regiões com uma temperatura entre 20 e 30°C e úmidas no verão, manifestando-se nos órgãos que afeta, na forma de lesões necróticas, salientes, de coloração marrom, muitas vezes circundada por halo amarelo quando em folhas e frutos. Como se observa na Figura 1, os sintomas geralmente são muito característicos, mas podem variar de acordo com o órgão afetado, idade e genótipo do hospedeiro (AMARAL, 2004). Cabe ressaltar que uma lesão de cancro cítrico em média abrange cerca de 0,6% da área foliar (BELASQUE JÚNIOR *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Sintomas do cancro cítrico em folhas, frutos e ramos. FUNDECITRUS, 2015a.

A bactéria entra no tecido da planta hospedeira através dos estômatos e ferimentos, que podem ser mecânicos, causados por equipamentos ou, atrito entre partes da própria planta, ou causados por insetos como o minador dos citros, principalmente em suas fases imaturas, devido à formação de galerias nas folhas (AMARAL, 2004; CHAGAS *et al.*, 2001; GRAHAM *et al.*, 2004; SANCHÉZ, *et al.*, 2002).

Se a infecção ocorrer em condições ótimas para o desenvolvimento da bactéria, a multiplicação e colonização da mesma ocorre nos primeiros cinco dias de forma localizada, no espaço intercelular (mesófilo), processo este que provoca hiperplasia e hipertrofia. Aproximadamente nove dias após a infecção os primeiros sintomas se tornam evidentes, sendo visível, na face inferior das folhas, bolhas um pouco elevadas de coloração marrom clara, ocorrendo a formação de pústulas 30 dias após a infecção. À medida que a doença avança, as lesões aumentam de tamanho e apresentam uma tonalidade marrom mais escura com aspecto semelhante a verrugas. As margens das lesões apresentam o efeito do encharcamento e, muitas vezes, encontram-se rodeadas por halos cloróticos ou amarelados. O centro das lesões torna-se saliente e esponjoso, sendo visíveis nos dois lados da folha. Quando a doença está em estágio mais avançado, as lesões podem apresentar, ainda, halo de coloração escura e rachaduras no centro, resultando na morte do tecido foliar (GRAHAM, *et al.* 2004).

A sobrevivência da bactéria e a continuidade da doença no pomar ao longo dos anos ocorrem pelas lesões velhas na planta que permanecem de um ano para outro, onde o inóculo pode ser disperso por chuvas, ventos fortes ou pelo homem, que poderão dar início a um novo ciclo da doença sob as condições favoráveis de desenvolvimento (GRAHAM, *et al.* 2004; FUNDECITRUS, 2015a).

## **2.4 Manejo e controle do cancro cítrico no Brasil**

A única forma de eliminar o cancro cítrico do pomar é por meio da erradicação das plantas. Se nos remetermos somente ao século XXI, entre 2001 e 2009, a doença no Brasil manteve baixas incidências de talhões contaminados, variando entre 0,08% e 0,20%, devido à exigência, no estado de São Paulo, de erradicação

de todo o talhão de plantas em situações que o índice de contaminação fosse igual ou maior que 0,5% do total de plantas. Em meados de 2009 esta exigência foi abolida e, conseqüentemente, a partir de 2010, o cancro cítrico começou a avançar e chegou a 0,44% de talhões contaminados. Em 2012, atingiu 1,39%, registrando a maior incidência da doença desde seu primeiro relato, em 1957 em Presidente Prudente (FUNDECITRUS, 2015a)

Em 1º de novembro de 2013, foi publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo a Resolução SAA - 147, onde ficou estabelecido que somente devem ser erradicadas as plantas com sintomas e pulverizadas com produtos à base de cobre as plantas cítricas existentes em um raio de 30 metros (FUNDECITRUS, 2014). A pulverização deve ser repetida a cada brotação. Mediante testes foi evidenciado que a bactéria não é resistente ao cobre, mas sim tolerante a doses intermediárias entre 50 e 90 g Cu met/100 L (BELHAU *et al.*, 2008 e FUNDECITRUS 2015a). A decisão de se tomar medidas de controle ou erradicação da planta contaminada depende do produtor, de acordo com a melhor relação custo-benefício (SANCHES *et al.*, 2014).

Além do tratamento com cobre, medidas preventivas podem ser tomadas para evitar a contaminação com o agente etiológico do cancro cítrico, como: 1) o citricultor deve realizar, no mínimo, uma vistoria trimestral em todas as plantas de citros da propriedade, eliminando plantas que apresentem sintomas do cancro cítrico; 2) o citricultor deve adquirir mudas sadias, produzidas em viveiros protegidos, onde se realizam medidas preventivas em conformidade com a legislação (OLIVEIRA *et al.*, 2008); 3) o plantio de quebra-ventos (casuarina, eucalipto e grevílea) que protegem as árvores de ventos fortes, evitando ferimentos, além de impedir a disseminação do patógeno e contribuir para a eficácia das pulverizações como reforço na ação dos bactericidas cúpricos, (OLIVEIRA *et al.*, 2008); 4) o controle da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*, Stainton) que provoca ferimentos na planta, com aplicações de defensivos à base de abamectina diluídos em óleo mineral na concentração de 0,25%, (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000, BEHLAU *et al.*, 2007) e 5). A desinfecção, nas inspeções e nas colheitas, das mãos, de vestimentas e calçados, equipamentos como enxadas e sacolas, além de veículos e os diferentes implementos utilizados (TIMMER; GARNSEY; GRAHAM, 2000).

## 2.5 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) o agente causal do cancro cítrico

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas spp* (do grego, Xanthos: amarelo; monas: unidade), são bactérias Gram negativas, aeróbicas obrigatórias, com formato de bacilo e com único flagelo polar (RAJAGOPAL, *et al.*, 1997; MOHAMMADI; MIRZAEI; RAHIMIAN, 2001). Este gênero possui 20 espécies e 80 patovares, e atingem mais de 400 espécies de plantas, tanto mono como dicotiledôneas, apresentando especificidade pelos diferentes tecidos. A faixa de hospedeiros de cada patovar é limitada a espécies ou gêneros de uma família vegetal (SWINGS *et al.*, 1993; RYAN *et al.*, 2011).

A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), anteriormente classificada como *X. axonopodis* pv. *citri* e *X. campestris* pv. *citri* (SCHAAD *et al.*, 2006), é uma bactéria que pode ser cultivada em meios artificiais e que cresce em uma faixa ótima de temperatura entre 28 a 32 °C, com a formação das colônias podendo ser observada após 48 a 72 horas em meio sólido, as quais apresentam pigmentação amarela, bordas lisas e aspecto viscoso.

Foi feito o sequenciamento do genoma da Xac estirpe 306, que possui um cromossomo circular de 5,17 Mb e dois plasmídeos, o pXac64 (64,92 kb) e o pXac33 (33,70 Kb) (DA SILVA *et al.*, 2002). No cromossomo foram encontradas 4313 ORFs (Open Reading Frames), das quais 1603 (37,17%) não tinham função conhecida e foram anotadas como hipotéticas. O conhecimento do genoma desta bactéria tornou possível a abordagem de genômica funcional para o estudo do patossistema citros-Xac, através da genômica comparativa, da transcriptômica, da proteômica, e da metabolômica, com vistas a identificar os genes relacionados ao processo de adaptação do patógeno na planta bem como os genes do patógeno associados com patogenicidade e virulência nos diferentes hospedeiros de citros (MOREIRA *et al.*, 2010; RYAN *et al.*, 2011). Da mesma forma, permite também verificar os mecanismos moleculares utilizados pelo hospedeiro para se defender da infecção e da instalação do patógeno, ainda que não seja suficiente para deter a doença.

## 2.6 Interação planta - patógeno

O controle e erradicação do cancro cítrico não é uma tarefa fácil, principalmente, pela virulência (do latim *vírus*: veneno/*entia*: ação ou estado) da *Xac* quando presente em uma planta de citros. Em termos gerais a virulência é a capacidade do patógeno para induzir uma doença em determinado indivíduo, o que caracteriza primordialmente a relação existente entre certo microrganismo e seu hospedeiro, a qual pode ser compatível ou incompatível (DO AMARAL, 2004).

Em geral a interação planta-patógeno envolve um sistema de “ataque e defesa”: primeiro com o ataque do patógeno a planta inicia uma morte celular programada no tecido atacado, em seguida a resposta do patógeno será de tentar desativar o sistema de defesa da planta, o que estimula no hospedeiro a produção de substâncias para evitar a instalação dos microrganismos (STAHL; BISHOP, 2000; ARNOLD *et al.*, 2007; KOORNNEEF, 2008). Os sistemas de defesa na planta estão ligados à expressão de muitos genes regulados por rotas de sinalização específicas, que são inter-relacionadas e que são ativadas segundo o tipo de agente patogênico (WALTERS, 2009).

Na interação compatível o patógeno pode usar o estímulo à determinada sinalização pela síntese de compostos na planta, incluindo mímicos de reguladores, ou promovendo a degradação de outros compostos, como estratégia para confundir os sistemas de defesa, além de utilizar fatores de virulência como são as toxinas e as enzimas secretadas pelos diferentes sistemas de secreção, principalmente o sistema de secreção tipo III, que as liberam no meio intracelular das células da planta, favorecendo seu desenvolvimento no tecido, o que leva à colonização da planta hospedeira (MATTOS Jr.; QUAGGIO; BOARETTO, 2010). A disseminação da bactéria não garante a ocorrência da doença, primeiro é necessário que a bactéria colonize o tecido. Além do patógeno, para que ocorra a interação compatível é necessário um hospedeiro suscetível e condições climáticas favoráveis (DELANEY, 1997; DO AMARAL, 2004).

A defesa da planta está relacionada com a interação incompatível, quer dizer, um hospedeiro resistente e um patógeno avirulento, que leva a uma Resposta de Hipersensibilidade (HR), onde são codificadas proteínas de sinalização que ativam a

expressão de genes que codificam proteínas relacionadas à patogênese (*PR*), impedindo a entrada e disseminação do patógeno por meio da produção de enzimas de processos oxidativos, reparação de tecidos, lignificação e outras barreiras estruturais celulares (REYMOND; FARMER, 1998). Nesta incompatibilidade, os genes de resistência da planta codificam proteínas receptoras (*R*) capazes de interagir especificamente com proteínas efetoras codificadas por genes de avirulência (*avr*) presentes no patógeno (MADRIZ, 2002). Mas para entender melhor as interações hospedeiro–patógeno é necessário definir os modos de ação dos efetores dos patógenos, assim como os processos biológicos e moleculares utilizados pelo hospedeiro no confronto com o patógeno.

## 2.7 ORF XAC1008

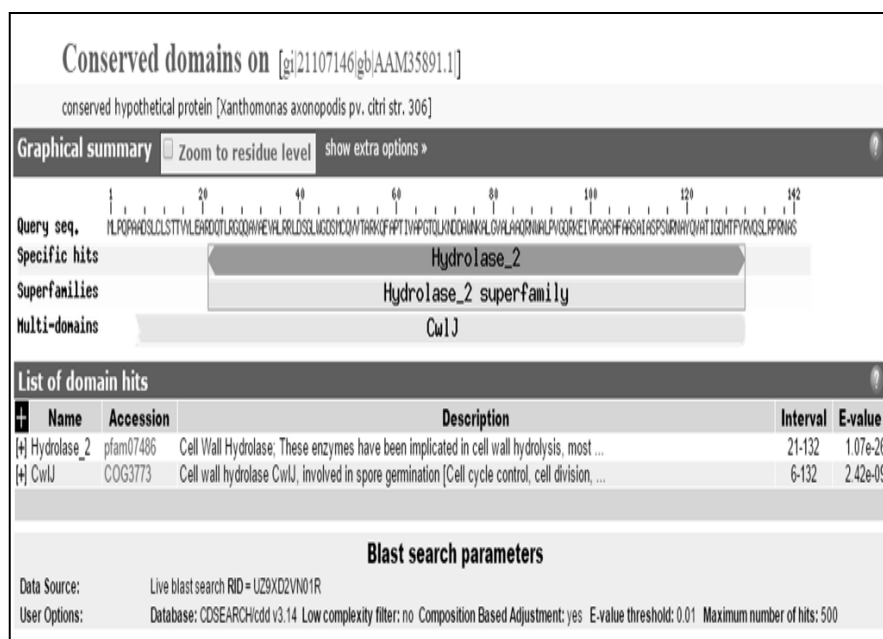
As proteínas são as moléculas pelas quais a informação genética contida nos genes se traduzem em ações concretas nas células dos organismos. Assim, o estudo das proteínas e suas interações com outras macromoléculas permite conhecer os mecanismos moleculares de um processo biológico e bioquímico, no qual pode estar envolvida uma ou mais proteínas. A compreensão da estrutura e função das proteínas passa pela separação e purificação das mesmas, para o que se necessita da utilização de diversas técnicas físicas e bioquímicas (LEHNINGER, 2014).

Outra maneira de obter informação sobre a função de uma proteína é nocautear o gene que a codifica e verificar que processos na célula ou no organismo foram alterados ou suprimidos. A proteína XAC1008, codificada pela ORF XAC1008 presente na fita complementar, é uma proteína hipotética presente na Xac 306, e predita pelo Pfam (*Protein families database*) e COG (*Clusters of Orthologous Groups database*) como uma proteína de parede celular com domínio hidrolase\_2 (Figura 2). A ORF XAC1008 tem 459 pb, codificando uma proteína de 153 aminoácidos (aa), onde os primeiros 17 aa constituem a região do peptídeo sinal (Figura 3). Embora predita como uma proteína de parede celular com domínio hidrolase\_2, não há confirmação experimental da sua função. Hidrolases de parede celular são essenciais no processo de divisão celular (LEE; HUANG, 2013), sendo

também importantes em diversos grupos bacterianos, associadas a funções de predação, motilidade, evasão imune, estrutura da comunidade bacteriana, e envolvida em processos de latência. Os mecanismos através dos quais estas hidrolases atuam nesses processos biológicos ainda não são completamente entendidos (WYCKOFF; TAYLOR; SALAMA, 2012). Em patógenos de animais, hidrolases de parede de peptidoglicano modulam a forma da bactéria, afetando a patogênese e a interação com o hospedeiro (FRIRDICH; GAYNOR, 2013).

A existência de grandes coleções de mutantes, bem como a disponibilidade de informações em extensas bases de dados internacionais, são importantes fatores que contribuem para identificar genes relacionados com a virulência (DE SÁ *et al.*, 2015). Diferentes estudos de mutação aleatória (LAIA *et al.*, 2009; TRIVEDI; WANG, 2013) e dirigida (MACHADO, 2015) tem sido desenvolvidos com este fim para *Xac*.

O gene que codifica a ORFXAC1008 teve sua expressão aumentada de maneira significativa quando avaliada a expressão gênica global de dois mutantes de *Xac* 306 relacionados com a virulência da bactéria (SOUZA, 2010). A pergunta que se fez neste trabalho foi: qual é a função da proteína codificada pela ORF XAC1008? Para respondê-la lançou-se mão da mutagênese sítio-dirigida para nocautear a ORF e avaliou-se algumas características do mutante frente à *Xac* selvagem.



**Figura 2:** Predição da localização celular e do domínio hidrolase\_2 da proteína codificada pela ORF XAC1008 da *Xac*306, pelos programas COG e Pfam.

```

A. ATGAAACTTGTTTGGATACTCTGGCTGTGCGATGTGTTGCCGCAGCCAGCTGCAGATTCGCTGTG
TTTGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGGACCAGACCTTGCGTGGCCAGCAGGCCGTTGCAG
AAGTTGCATTGCGTTCGCTGGATAGCGGTTTGTGGGGCGACTCGATGTGCCAGGTGGTCACTGCA
CGCAAGCAATTCGCGCCGACGATCGTGGCGCCAGGCACGCAGCTGAAGAACGACGATGCCTGGAA
CAAGGCTTTGGGCGTGGCACTGGCGGCGCAGCGCAACTGGGCATTGCCGGTTGGCCAACGCAAAG
AAATCGTGCCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCC
TATCAGGTGGCCACCATCGGCGACCACACGTTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCC GCGCAACGC
GTCCTGA

B. MKLVWILWLSHVLPQPAADSLCLSTTVYLEARDQTLRGQQAVAEVALRRLDSGLWGDSMCQVVTA
RKQFAPTIVAPGTQLKNDDAWNKALGVALAAQRNWALPVGQRKEIVPGASHFAASAIASPSWRNA
YQVATIGDHTFYRVQSLRPRNAS

```

**Figura 3:** Sequência de nucleotídeos da ORF XAC1008 (A) e da sequência de aminoácidos que ela codifica (B). Os aminoácidos que correspondem ao peptídeo sinal da proteína estão apresentados em negrito (região N-Terminal).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma caracterização funcional da ORF XAC1008 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306 (Xac 306) utilizando como estratégia o nocaute gênico por mutagenese sítio-dirigida e recombinação homóloga.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliação funcional do mutante  $\Delta$ XAC1008 em comparação com a Xac 306 selvagem por inoculação em folhas de limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e laranja 'Pêra Rio' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)
- Determinação da curva de crescimento *in vitro* e *in planta* do mutante  $\Delta$ XAC1008 em comparação com a Xac 306 selvagem.
- Verificação da capacidade do mutante  $\Delta$ XAC1008 de formar biofilme em comparação com a Xac 306 selvagem.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

No desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizadas diferentes estirpes bacterianas (Tabela 2). As cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) foram mantidas em meio LB (Luria-Bertani) composto por 10 g/L de NaCl, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona para meio líquido, acrescidos de 15 g/L de ágar para meio sólido. As bactérias foram mantidas entre 12 e 16 horas em estufa a 37°C, para sua multiplicação, e, quando mantidas em meio líquido, multiplicadas sob agitação a 200 rpm entre 12 e 16 horas em estufa a 37°C. Para o crescimento da Xac isolado 306, foi utilizado o meio de cultura NB (Nutrient Broth) (3 g/L de extrato de carne, 5 g/L peptona) ou NA (Nutrient Agar) composto por NB acrescido de 15 g/L de ágar. As bactérias foram incubadas em estufa a 28°C por 72 horas e, quando cultivadas em meio líquido, foram mantidas sob agitação constante a 180 rpm, por 16 horas a 28°C.

**Tabela 2.** Cepas bacterianas utilizadas para a obtenção do mutante da ORF XAC1008.

Cepa bacteriana	Característica	Origem
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ $\lambda$ pir	E44, $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ lacZ $\Delta$ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1, $\lambda$ pir phage lysogen	Biomedal
<i>E. coli</i> DH10B	F <sup>-</sup> endA1, recA1, galE15, galK16, nupG, rpsL, $\Delta$ lacX74, $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15, araD139, $\Delta$ (ara, leu)7697, mcrA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\lambda$ <sup>-</sup>	Invitrogen <sup>IM</sup>
<i>E. coli</i> SM10 $\lambda$ pir	KmR, thi-1, thr, leu, tonA, lacY, supE, recA::RP4-2-Tc::Mu, pir	Biomedal
Xac 306 ( <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> )	Cepa selvagem	LBM*
$\Delta$ XAC1008	Mutante ORFXAC1008	Produto deste trabalho-LBM

\* Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP

## 4.2 Vetores e oligonucleotídeos utilizados

Os vetores e oligonucleotídeos que foram utilizados no presente trabalho estão descritos nas tabelas 3 e 4 abaixo:

**Tabela 3.** Vetores utilizados nas etapas de clonagem para a obtenção do mutante da ORF XAC1008. O vetor 1DD01-LawrisT4 é o único cosmídeo utilizado, sendo os demais, vetores plasmidiais.

Vetor	Característica	Fonte	Antibiótico de seleção em µg/mL	Cepa Bacteriana
<b>1DD01-LawrisT4</b>	λ Cos, Kan R	Biblioteca genômica-CREBIO *	Canamicina /50	<i>E. coli</i> DH10B
<b>pET SUMO</b>	T7lac, N-terminal 6xHis, <i>lacI</i> , proteína SUMO de clivagem, pBR322	INVITROGEN	Ampicilina /100	<i>E. coli</i> DH10B <i>E. coli</i> C41
<b>pGEM-T easy</b>	Apr, lacZ	PROMEGA	Ampicilina /100 Carbenicilina/100	<i>E. coli</i> DH10B
<b>pOK1</b>	R6K, SacB, SacR, nobRK2, SpR	Koné Kaniga	Espectinomicina /100	<i>E. coli</i> DH5α <i>λpir</i>
<b>pOK1+XAC 1008AD</b>	R6K, SacB, SacR, nobRK2, SpR.	Este trabalho-LBM.	Espectinomicina /100	<i>E. coli</i> SM10 λ <i>pir</i> Xac 306
<b>PUC 19</b>	Apr, lacZα	NEB-New England Biolabs	Ampicilina/100	<i>E. coli</i> DH10B, <i>E. coli</i> C41

\*CREBIO: Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da FCAV/UNESP

**Tabela 4.** Oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante da ORF XAC1008, foram desenhados manualmente a partir da sequência da ORF XAC1008.

Nome do produto	Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	Tamanho esperado do amplicon (pb)
<b>ORFXAC1008</b>	F_1 R	GCAGATTCGCTGTGTTTGAGTA TCAGGACGCGTTGCGCGGG	411
<b>Fragmento AB</b>	A B	AGCTGCAGATTCGCTGTGT CGCCCGGCACCACAAACCGCTATC CAGG	127
<b>Fragmento CD</b>	C D	GGTTTGTGGTGCCGGGCGCCAGC CACTT TTGCGCGGGCGCAGCGATT	130
<b>ΔXAC1008</b>	A D	AGCTGCAGATTCGCTGTGT TTGCGCGGGCGCAGCGATT	239
<b>Sequenciamento</b>	T7 Promoter-F Sp6	TAATACGACTCACTATAGGG TTCTATAGTGTACCTAAT	416

### 4.3 Mutagênese sitio-dirigida mediante recombinação por homologia

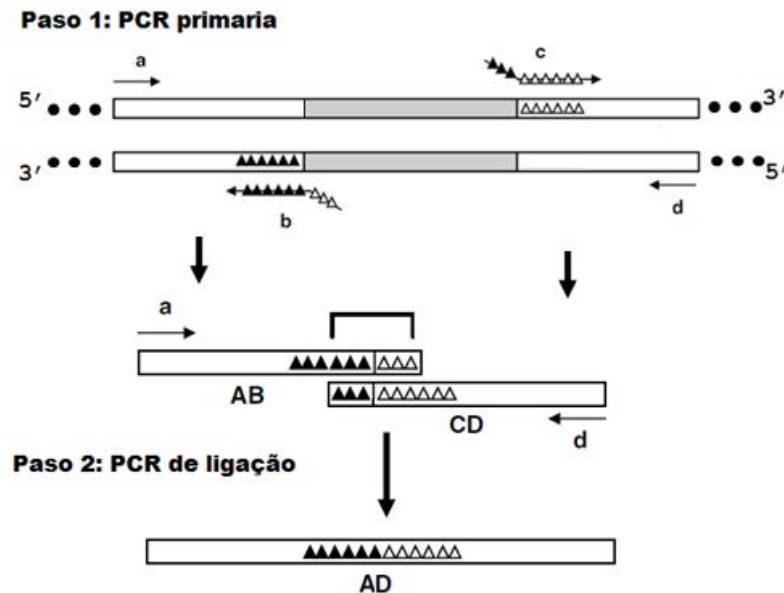
#### 4.3.1 Mutagênese por deleção da ORF XAC1008

Para a obtenção do mutante da ORF XAC1008 foi utilizada a estratégia de mutagênese por deleção descrita por Lee *et al.* (2010) utilizando como molde o DNA de um cosmídeo contendo a ORF XAC1008 clonada.

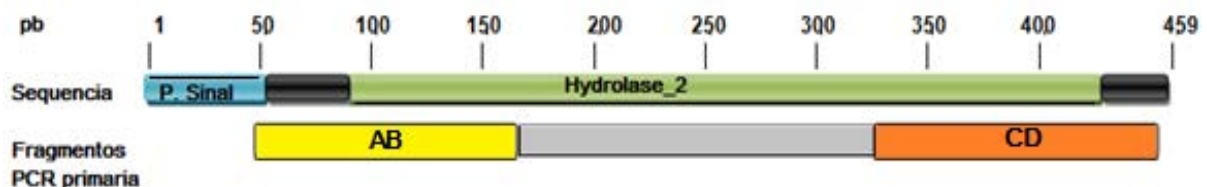
O DNA contendo a ORF XAC1008 foi isolado a partir do cosmídeo 1DD01-LAWRIST4, pertencente à biblioteca genômica de Xac 306 do CREBIO (Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica). Uma alçada do clone de *E. coli* DH10B contendo o cosmídeo foi plaqueada em meio LB sólido com o antibiótico de seleção canamicina (50 µg/mL) e a placa foi mantida a 37°C por 12 horas. Uma colônia isolada foi coletada e transferida para um tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 3 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico canamicina (50 µg/mL), sendo o tubo então mantido sob agitação a 200 rpm, por 16 horas, a 37°C. Após a multiplicação, o DNA cosmidial foi purificado através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. As absorvâncias a 230, 260 e 280nm foram determinadas no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific), sendo que a concentração de DNA foi calculada pelo valor da absorção a 260 nm e pureza do DNA foram estimadas pelas relações A280/A260 nm e A230/A260 nm (SANDBROCK; 1989).

O primeiro passo para a construção do mutante envolveu duas reações de PCR independentes utilizando o DNA cosmidial como molde e os pares de iniciadores A/B e C/D, sendo que os iniciadores B e C possuem uma cauda complementar entre si (Tabela 4). O resultado são os produtos de PCR AB e CD. Os produtos AB e CD são então utilizados como molde em uma segunda reação de PCR utilizando os iniciadores A e D, que resulta em um único fragmento que corresponde à fusão dos fragmentos AB e CD através da cauda complementar dos iniciadores B e C. A região 5' do iniciador B possui nove nucleotídeos correspondentes ao complemento reverso do iniciador C, enquanto o iniciador C contém na região 5' nove nucleotídeos complementares ao complemento reverso do

iniciador B (Figura 4). Isso resulta na deleção de uma região central da ORF XAC1008 (Figura 5).



**Figura 4:** Modelo esquemático da mutagênese por deleção, adaptado de LEE *et.al.* (2010). No primeiro passo, designado de PCR primária, são utilizados dois pares de iniciadores para gerar os fragmentos AB e CD. Uma segunda PCR, denominada de PCR de ligação, se obtém o produto AD, que é um a versão curta do gene. A região do gene a ser deletada está mostrada em cinza.



**Figura 5:** Representação das características da sequência de nucleotídeos que codifica a ORF XAC1008. Em azul a região que codifica o peptídeo sinal, em verde a região que compõe o domínio hidrolase\_2 hipotético nesta proteína, em cinza a região que se deseja deletar após a PCR de ligação entre os fragmentos AB e CD representados em amarelo e laranja, respectivamente.

As reações de PCR para a obtenção dos fragmentos AB e CD procederam-se como descrito a seguir. Os fragmentos AB e CD foram obtidos a partir de reações de PCR em um volume final de 20  $\mu$ L contendo: 4  $\mu$ L de 5X Phusion GC buffer, 0,4  $\mu$ L de DNTPs (10 mM), 1  $\mu$ L de cada iniciador (A e B ou C e D) a 10 mM cada, 1  $\mu$ L de

DNA cosmidial (15 ng/ $\mu$ L), 0,2  $\mu$ L de *Taq Phusion DNA Polymerase* (Thermo Scientific) e 12,4  $\mu$ L de água ultrapura estéril. Um teste de gradiente de temperatura no ciclo de hibridação, onde foram testadas as temperaturas de 64, 66, 68 e 70°C, mostrou que a melhor temperatura de hibridização era 66°C. Assim, as condições de amplificação utilizadas foram: desnaturação inicial a 98°C durante 1 min, 25 ciclos de desnaturação a 98°C durante 15 seg, anelamento a 66°C durante 15 seg e extensão a 72°C por 30 seg. Após o último ciclo, a reação se processou por mais 10 min a 72°C para permitir que a extensão fosse completada. Os fragmentos AB e CD resultantes da PCR primária, com tamanhos preditos de 127 e 130 pb, respectivamente.

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,0% para verificar quais apresentavam um produto do tamanho esperado para os fragmentos AB (127 pb), CD (130 pb) e AD (239 pb). A determinação do tamanho de fragmentos de DNA, bem com a visualização da sua pureza, foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v). O tampão utilizado foi o Tris-Borato-EDTA (TBE), na concentração de 0,5 X (44,5 mM Tris-Base, 44,5 mM Ácido Bórico e 1 mM EDTA), tanto para a confecção do gel como para a corrida, a qual se processou a 80 V (3V/cm). As amostras aplicadas no gel continham 1X Tampão da amostra, sendo que a solução estoque do Tampão da amostra era 6X concentrada (60 mM EDTA pH 8,0, 0,6% SDS, 30% glicerol, 0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol FF). Como agente intercalante foi utilizado o brometo de etídio (1  $\mu$ g/mL), aplicado diretamente no gel quando da sua confecção (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Após a corrida, o gel foi revelado e fotografado com o equipamento *Molecular Imager® Gel Doc™ XRT Imaging System* (Bio-Rad).

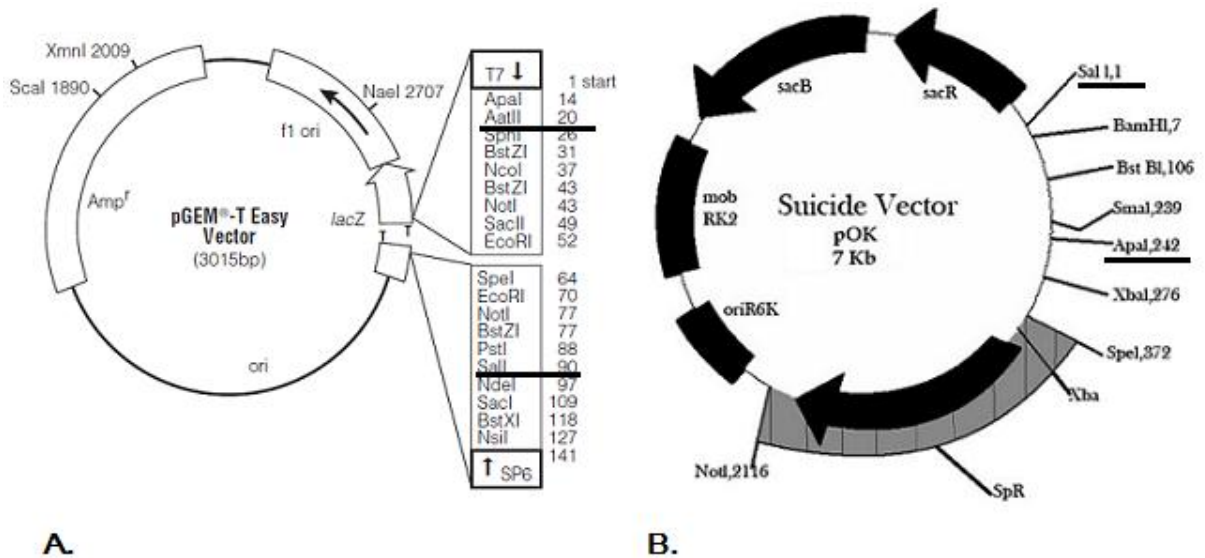
Uma vez confirmado os tamanhos, os produtos da PCR foram purificados com o *Invitrogen Purelink Quick Gel Extraction Kit* segundo as especificações do fabricante, e a concentração e qualidade dos mesmos foi estimada no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) como descrito anteriormente.

Os produtos AB e CD foram então utilizados como molde para a PCR de ligação, onde as condições de reação foram similares às utilizadas para amplificar os fragmentos AB e CD, apenas que neste caso os iniciadores utilizados foram o A e D e, como DNA molde, foram utilizados 1  $\mu$ L de DNA (15 ng/ $\mu$ L) de cada um dos

produtos AB e CD. O tamanho do produto do fragmento AD, com tamanho predito de 239 pb, foi analisado em gel de agarose 1% para confirmação do tamanho, após o que foi purificado com o *Invitrogen Purelink Quick Gel Extraction Kit* segundo as especificações do fabricante. A concentração e a qualidade foram estimadas no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific) como descrito anteriormente, sendo então utilizado para clonagem no vetor pGEM®-T-Easy (Promega).

#### 4.3.2 Clonagem no vetor pGEM®-T-Easy (Promega)

Uma vez que o fragmento AD não contém sítios de restrição compatíveis com o vetor suicida pOK1 (Figura 6B) que será utilizado para a recombinação homóloga do gene mutado no DNA genômico da Xac 306, foi preciso fazer inicialmente a sub clonagem no vetor pGEM®-T-Easy (PROMEGA) (Figura 6A) para posterior clonagem no vetor pOK1. Para isso foi necessária a adição de um mononucleotídeo de adenina (A) nas extremidades 5' do produto AD para ligação no vetor pGEM®-T-Easy, que é um vetor que tem um mononucleotídeo de Timina (T) nas suas extremidades 3' abertas. A adição do mononucleotídeo de adenina nas extremidades 5' do fragmento AD ocorreu imediatamente após a sua purificação, utilizando as seguintes condições: 12 µL do produto de PCR AD purificado (48,5 ng/µL), 2 µL do tampão de reação 10X com MgCl<sub>2</sub> da *Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific), 0,1 µL dATP (100 mM) (Fisher), 0,2 µL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/µL) (Thermo Scientific) e água ultrapura estéril para 20 µL de volume final. A reação processou-se por 10 min, a 72°C, por 10 min, no termociclador. Em seguida foi realizada a ligação no vetor pGEM®-T-Easy (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. Em um microtubo tubo de 0,5 mL foi adicionado 1 µL de vetor pGEM®-T-Easy (50 ng/µL), 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase, 2 µL do produto de PCR AD com as extremidades 5' contendo o mononucleotídeo A (29,1 ng/µL), 1 µL de T4 ligase (3 U/µL) e a reação foi mantida por 16 horas a 4°C. Um controle positivo e um controle negativo foram feitos como indicado pelo fabricante.



**Figura 6:** Mapa do vetor de clonagem pGEM®-T-Easy (A) e do vetor suicida pOK1 (B). Os sítios de restrição utilizados para clonagem do fragmento AD nestes dois vetores estão grifados.

A reação de ligação obtida do procedimento anterior foi utilizada para a transformação em células de *E. coli* DH10B quimiocompetentes. As células de *E. coli* DH10B foram preparadas segundo o protocolo de AZEVEDO (2003) com algumas modificações. Para tanto, foi plaqueada uma amostra de cada estirpe de interesse em meio LB sólido, sendo estas incubadas por 16 horas a 37°C. Posteriormente, uma colônia isolada de cada amostra foi transferida para 5 mL de meio LB líquido e mantidas sob agitação a 200 rpm, a 37°C, por 16 horas (pré-inóculo). Em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para um frasco tipo Erlenmeyer de 2 L contendo 300 mL de meio LB líquido (inóculo), sendo os frascos mantidos sob agitação a 200 rpm até a obtenção de uma DO<sub>600nm</sub> (densidade óptica) entre 0,4 e 0,6 (aproximadamente 3 horas). Após obtenção da DO desejada, o inóculo foi mantido em banho de água e gelo durante 15 min. Em seguida, cada inóculo foi distribuído em seis tubos tipo Falcon de 50 mL previamente mantidos em gelo e centrifugados a 4°C, 3040 g, por 12 min, sendo o sobrenadante descartado ao final da centrifugação. O precipitado resultante de cada tubo foi ressuspensionado em 10 mL de uma solução estéril e gelada de cloreto de cálcio e glicerol (0,1 M; 20% de glicerol). Após a ressuspensão, a suspensão de bactéria foi centrifugada nas mesmas condições descritas anteriormente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de cada tubo foi novamente ressuspensionado em 1 mL de solução gelada de cloreto de cálcio e

glicerol (0,1 M CaCl<sub>2</sub>; 20% de glicerol) e a suspensão foi novamente centrifugada como nas condições acima. O precipitado de todos os tubos foi ressuspensionado em um volume final de 2 mL em um único tubo. A suspensão de células foi alíquotada, em volumes de 50 µL, em microtubos de 1,5 mL, os quais foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e conservados em ultrafreezer a -80°C até o momento de uso.

Para a transformação em células de *E. coli* DH10B, foram adicionados 100 ng/µL de produto de ligação em um microtubo de 1,5 mL contendo células de *E. coli* quimiocompetentes, mantido em gelo, com a mistura sendo feita gentilmente com as mãos. As células foram mantidas em gelo por mais 20 min e, em seguida, transferidas para um banho-maria a 42°C por 45 seg, sendo retornadas ao gelo imediatamente e nele mantidas por mais 2 min. Estas células foram recuperadas mediante a adição de 950 µL de meio LB líquido e incubação por 1,5 horas, a 37°C e 150 rpm. Ao final, as células foram plaqueadas em duplicata (100 µL e 200 µL) em placas contendo meio LB sólido com o antibiótico carbenicilina (100 µg/mL), IPTG (1 mM) e X-GAL (2 %), as placas foram incubadas por 12 horas a 37°C. As colônias brancas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL, contendo 5 mL de meio LB líquido acrescido de carbenicilina (100 µg/mL) e incubadas por 16 horas, a 37°C, sob agitação de 225 rpm. O DNA plasmidial de cada clone foi purificado com o kit *The Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com o recomendado pelo fabricante, exceto na eluição do DNA plasmidial da coluna. A eluição foi feita em dois passos, sendo que em cada um adicionou-se 40 µL de água livre de nucleasse, seguido de 1 min de centrifugação a 14.000 g. O sugerido pelo kit é eluição em um único passo utilizando 100 µL de água livre de nucleasse. Após a eluição, o DNA plasmidial foi quantificado usando o valor de absorbância a 260 nm, o qual foi determinado no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific). A presença do fragmento AD clonado no DNA plasmidial purificado de cada clone foi verificada por PCR utilizando como iniciadores os oligonucleotídeos A e D. Em microtubos de 0,2 mL foram adicionados 1 µL de cada DNA plasmidial (20 ng/µL), 2 µL de 10X Buffer Taq, 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada iniciador 10 mM (A e D), 0,25 µL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/µL) e água ultrapura estéril para um volume final de 20 µL. A reação de PCR se processou nas seguintes



condições: desnaturação inicial a 94°C durante 1 min, 25 ciclos de desnaturação a 94°C durante 15 seg, anelamento a 66°C durante 15 seg e extensão a 72°C por 30 seg. Após o último ciclo, a reação se processou por mais 10 min a 72°C para permitir que a extensão fosse completada. Os produtos de amplificação de cada um dos DNAs plasmidiais foram analisados em gel de agarose a 1,0% como descrito anteriormente para verificar quais apresentavam um produto do tamanho esperado para o fragmento AD (239 pb).

O DNA plasmidial daqueles que amplificaram um fragmento do tamanho esperado foi enviado para sequenciamento com os oligonucleotídeos do vetor pGEM®-T-Easy (T7 e SP6) para confirmação da sequência clonada. O vetor pGEM®-T-Easy contendo a construção AD clonada (pGEM®-T-Easy-AD) foi então utilizado como doador da mesma para clonagem no vetor suicida pOK1. Este procedimento foi realizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da FCAV/UNESP (CREBIO)<sup>1</sup>. As reações de sequenciamento das diferentes amostras, realizadas em placas de 96 poços, continham 1 µL de DNA plasmidial (100 ng/µL), 3,0 µL de tampão Save Money 2,5 X (200 mM Tris-HCl pH 9,0, 5,0 mM MgCl<sub>2</sub>), 1,0 µL de BigDye v3.1 (Applied Biosystems), 10 picomoles de cada oligonucleotídeo iniciador, com o volume sendo completado para 10 µL com água ultrapura estéril. As amplificações em termociclador *Veriti® 96 well* (Applied Biosystems) consistiram de uma desnaturação inicial a 96°C por 1 min e 39 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 seg, anelamento a 55°C por 15 seg e polimerização a 60°C por 4 min. Imediatamente após a amplificação adicionou-se às amostras 80 µL de isopropanol 75 % e as mesmas foram mantidas à temperatura ambiente por 15 min e em seguida centrifugadas a 3040 g por 20 min a 20°C. O sobrenadante foi descartado e lavado duas vezes com 200 µL de etanol 70 % e centrifugado a 3040 g por 10 min a 20°C. Por último, as amostras foram secas a vácuo, ressuspensas em 10 µL de formamida, desnaturadas por 5 min a 95°C e submetidas ao sequenciamento no sequenciador automático *ABI 3730 XL DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)) conforme as recomendações do fabricante.

---

<sup>1</sup> FANCIANI, A.; MOTA, M. Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica da FCAV/UNESP (CREBIO). Comunicação Pessoal, 2014.

As sequências obtidas foram analisadas manualmente e comparadas com as sequências de interesse para confirmar a identidade das mesmas e não ocorrências de mutações, deleções ou inserções.

#### 4.3.3 Obtenção do vetor pOK1

O plasmídeo pOK1 é um vetor suicida que possui a origem de replicação R6K (oriR6K), o que condiciona a sua manutenção e replicação apenas em linhagens de *E. coli* que contém o gene *pir*. No LBM o plasmídeo pOK1 é mantido em células de *E. coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$ *pir*. Assim, para a obtenção do DNA plasmidial uma alíquota do estoque a -80°C de *E. coli* DH5 $\alpha$   $\lambda$ *pir* contendo o plasmídeo pOK1 foi plaqueada em meio LB sólido contendo o antibiótico de seleção espectinomicina (100  $\mu$ g/mL), seguido da multiplicação das células em estufa por 16 horas a 37°C. Uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico espectinomicina (100  $\mu$ g/mL) em um tubo tipo Falcon de 50 mL, sendo então incubada por 16 horas, a 37°C, sob agitação constante de 225 rpm. Esta cultura foi então utilizada para a extração e purificação do plasmídeo pOK1 sob as mesmas condições descritas anteriormente para o plasmídeo pGEM®-T-Easy (PROMEGA).

#### 4.3.4 Clonagem da construção AD no vetor pOK1

O vetor pGEM®-T-Easy contendo a construção AD clonada (pGEM®-T-Easy-AD) e o vetor pOK1 (Figura 6) foram digeridos separadamente com as enzimas de restrição *Apal* e *SaII*-HF (New England Biolabs-NEB). A reação de digestão para cada amostra foi realizada com 1  $\mu$ g de DNA, 2  $\mu$ L de *Apal* (5 U/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L de 10X NEBuffer e água ultrapura estéril para um volume final de 50  $\mu$ L. A digestão processou-se por 9 horas, a 25°C, em termociclador. Em seguida foram adicionados 2,5  $\mu$ L da enzima *SaII*-HF (2 U/ $\mu$ L) e a solução de reação foi mantida a 37°C por 9 horas para a digestão pela *SaII*. Finalmente, a solução foi colocada em um banho maria a 65°C, por 20 min, para inativar as enzimas *Apal* e *SaII*.

A purificação do fragmento AD liberado pela digestão do vetor pGEM®-T-Easy-AD foi realizada a partir de gel de agarose low melting a 0,8%. Após a

eletroforese a região do gel contendo o fragmento AD foi cortada e transferida para um microtubo de 1,5 mL, sendo então purificado com o Kit *Wizard® Sv gel and PCR Clean-up System* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA do vetor pOK1 linearizado foi também purificado a partir de gel de agarose low melting a 0,8%, à semelhança do fragmento AD. Tanto o fragmento AD purificado como o vetor pOK1 linearizado pela digestão com as enzimas de restrição *Apal* e *Sall* foram então quantificados usando o valor de absorbância a 260 nm, o qual foi determinado no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific).

Uma vez obtidos o fragmento AD e vetor pOK1 digeridos com as mesmas enzimas de restrição, o fragmento AD foi clonado no vetor pOK1 através da seguinte reação de ligação: 2 µL de tampão 2X T4 ligase (Promega) , 200 ng do vetor pOK1, 370 ng do fragmento AD (inserto), 2 µL de T4 DNA ligase (Promega) e água ultrapura estéril para um volume final de 20 µL. A reação foi mantida a 16°C por 16 horas e, em seguida, utilizou-se 10 µL da ligação para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* SM10  $\lambda$ pir como descrito anteriormente para *E. coli* DH10B. Adicionalmente, foi realizado um controle positivo da transformação com 90 ng de pOK1 sem digerir. Após a recuperação das células transformadas em meio LB, alíquotas de 200 µL foram espalhadas em placas de Petri contendo meio LB sólido e o antibiótico espectinomicina (100 µg/mL), obtendo-se no final 5 placas por amostra transformada. As placas foram então incubadas a 37°C por 16 horas e colônias isoladas foram repicadas em meio LB sólido contendo o antibiótico espectinomicina (100 µg/mL). A presença do fragmento AD no vetor pOK1 foi confirmada tanto por PCR utilizando os oligonucleotídeos A e D como iniciadores, bem como por sequenciamento, semelhante ao que foi feito para confirmar a sua clonagem no vetor pGEM®-T-Easy.

Para a recombinação homóloga em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é necessário o uso de grande quantidade de DNA na transformação. Assim, para a obtenção de grande quantidade do vetor pOK1 contendo o fragmento AD clonado, uma colônia isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico espectinomicina (100 µg/mL) em um tubo tipo Falcon de 50 mL, sendo então incubada por 16 horas, a 37°C, sob agitação constante de 225 rpm. Esta cultura foi então utilizada para a extração e purificação do plasmídeo recombinante

sob as mesmas condições descritas anteriormente para o plasmídeo pGEM®-T-Easy (PROMEGA).

#### **4.3.5 Transformação de células eletrocompetentes de Xac 306**

A obtenção do mutante da ORF XAC1008 de Xac 306 por recombinação homóloga utilizando a construção presente no vetor pOK1 requer a transformação de células eletrocompetentes de Xac 306 com este vetor. Inicialmente, células de Xac eletrocompetentes foram preparadas de acordo com LAIA<sup>2</sup>, com algumas modificações. Um estoque de Xac 306, obtido a partir de uma colônia isolada, e mantida no laboratório em água de torneira estéril à temperatura ambiente, foi espalhado com uma alça de Drigalski em placa de Petri contendo meio NA, a qual foi então incubada por 72 horas a 28°C. Um pré-inóculo foi então preparado pela inoculação de uma alçada das células em 2 mL de meio NB contidos em um frasco tipo Falcon de 15 mL, o qual foi incubado por 16 horas, a 28°C, com uma rotação constante de 180 rpm. Este pré-inóculo foi então transferido para um Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio NB (inóculo), o qual foi mantido sob agitação a 180 rpm, a 28°C, até atingir uma DO 600nm de 0,5, após o que foi distribuído em quatro frascos de centrífuga de 50 mL previamente gelados (banho de gelo), seguido de centrifugação a 3080 g, a 4°C, por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de cada tubo foi ressuscitado em 10 mL de água ultrapura estéril gelada. O volume de cada dois tubos foi juntado e completado para 40 mL com água ultrapura estéril gelada (1ª. lavagem). A seguir os dois tubos foram centrifugados a 3080 g, a 4°C, por 15 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi novamente ressuscitado em 40 mL de água ultrapura estéril gelada (2ª. lavagem), seguida de centrifugação a 3080 g, a 4°C, por 15 min. O precipitado resultante foi ressuscitado em 40 mL de glicerol 10% estéril gelado e centrifugado novamente sob as mesmas condições descritas acima. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em 2 mL de glicerol 10 % estéril gelado e a suspensão de bactéria foi distribuída em alíquotas de 50 µL em microtubos de 1,5 mL estéreis previamente gelados (banho de gelo) e mantidos no

---

<sup>2</sup> LAIA, M. coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal da UFVJM. Comunicação Pessoal, 2015.

gelo por mais 1 a 1,5 horas e utilizadas para a transformação por eletroporação. As células restantes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

A eletroporação foi realizada no equipamento *Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems* (Bio-Rad). Em duas cubetas de 2 mm de espessura, previamente geladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e colocadas em gelo imediatamente antes do uso, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de células eletrocompetentes de Xac 306 e 500 e 1000 ng de DNA do vetor pOK1 contendo o fragmento AD clonado, respectivamente. Em seguida procedeu-se à eletroporação programando uma voltagem de 2500 V e Tc (ms) de 2,6. As células foram recuperadas pela adição de 1 mL de meio NB suplementado com 50  $\mu\text{L}$  de glicose 20% e 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  1 mM em tubo tipo Falcon de 15 mL, seguido de incubação a  $28^{\circ}\text{C}$ , por 2 horas, a 180 rpm. Em seguida plaqueou-se 200  $\mu\text{L}$  da amostra em placas de Petri (5 placas para cada transformação) contendo meio NA com o antibiótico espectinomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As placas foram incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  e observadas às 24, 48 e 72 horas. Os controles utilizados na transformação foram: eletroporação com 500 ng e 1000 ng do vetor suicida pOK1 sem o fragmento AD clonado, eletroporação sem a adição de vetor pOK1 e eletroporação com 5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril.

#### **4.3.6 Seleção de células de Xac contendo a ORF XAC1008 mutada**

As colônias que após a transformação cresceram no tempo de 72 horas na presença do antibiótico espectinomicina foram replicadas em meio NA sem a presença de antibiótico e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Em seguida foram transferidas para meio NA com o antibiótico espectinomicina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, onde as colônias que não cresceram foram consideradas possíveis mutantes. As colônias que não se mostraram sensíveis ao antibiótico foram inoculadas em 5 mL de meio NB em tubo tipo Falcon de 50 mL e incubadas por 16 horas a  $28^{\circ}\text{C}$ . O DNA genômico destas bactérias foi extraído com o *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega), segundo as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado usando o valor de absorbância a 260 nm, o qual foi determinado no *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher

Scientific). A presença do fragmento AD no DNA genômico dos clones que se mostraram sensíveis ao antibiótico foi verificada por PCR usando os oligonucleotídeos A e D como iniciadores, seguida por eletroforese em gel de agarose do produto da PCR. A comprovação da presença da sequência AD no genoma foi verificada por sequenciamento do DNA genômico com os oligonucleotídeos A e D. A Xac 306 mutante para a ORF XAC1008 ( $\Delta$ XAC1008) foi então utilizada nos experimentos de avaliação funcional em comparação com a Xac 306 selvagem.

#### **4.3.7 Curva de crescimento bacteriano *in vitro***

Colônias isoladas de Xac 306 selvagem e do mutante  $\Delta$ XAC1008 crescidas em meio NA a 28°C, por 48 horas, foram inoculadas em 5,0 mL de meio NB em tubos tipo Falcon de 50 mL e incubadas a 28°C, por 16 horas, a 180 rpm. Em seguida a densidade óptica a 600 nm das amostras foi determinada e a concentração foi ajustada com meio NB para  $10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL), que corresponde a uma  $DO_{600nm}$  igual a 0,3 para Xac. A seguir, 500  $\mu$ L da suspensão bacteriana foi inoculada em nove Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio NB, os quais foram então mantidos a 28°C, a 180 rpm, com alíquotas de 100  $\mu$ L sendo retiradas nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 horas após a inoculação.

Em cada tempo de coleta, os 100  $\mu$ L retirados da cultura em crescimento foram diluídos de modo seriado em solução salina 0,85% (-1 a -5 nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 h e -4 a -8 nos tempos após 12 horas), finalmente 10  $\mu$ L das amostras diluídas foram plaqueadas em meio NA através de pipetagem em gota, em triplicata para cada uma das cinco diferentes diluições. As placas foram mantidas a 28°C por 48 horas para visualização e contagem das unidades formadoras de colônias.

#### **4.3.8 Curva de crescimento bacteriano em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck)**

Inóculos das bactérias Xac e  $\Delta$ XAC1008, a uma concentração de  $10^6$ , foram utilizados para a comparação do crescimento em plantas de limão 'Cravo' durante 18 dias. Células de Xac e  $\Delta$ XAC1008 crescidas a 28°C, por 72 horas, em meio NA, foram utilizadas para preparar um inóculo em um tubo tipo Falcon de 50 mL com 10 mL de PBS 1X (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,3) a uma  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,3 ( $10^8$  UFC/mL) e, mediante diluição seriada, foi obtida uma suspensão bacteriana a  $10^6$  UFC/mL.

Folhas de três plantas de limão 'Cravo' foram inoculadas em quatro pontos por meio da técnica de punção com agulha hipodérmica de 21 gauge (0,70 x 25). Estas plantas foram mantidas no laboratório de segurança do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, sob condições controladas de temperatura (28°C), luminosidade (fotoperíodo) e umidade. De cada planta foram coletados quatro discos com um diâmetro de 1 mm dos diferentes pontos de inoculação, nos tempos de 0, 1, 4, 8, 11, 15 e 18 dias após a inoculação, num total de 24 discos por coleta (3 plantas, 4 discos por planta, 2 bactérias). Em seguida cada disco foi macerado em 1 mL de PBS 1 X e uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  foi plaqueada em meio de cultura NA e incubada a 28 °C por 72 horas, após o que o número de colônias isoladas foram contadas. Para os três últimos tempos de coletas foram realizadas diluições 1:100 das amostras de Xac 306 antes do plaqueamento.

#### **4.3.9 Teste de patogenicidade em limão 'Cravo' (*Citrus limonia* Osbeck) e laranja 'Pêra Rio' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)**

Colônias isoladas de Xac 306 selvagem e do mutante  $\Delta$ XAC1008 crescidas em meio NA a 28°C, por 72 horas, foram diluídas em tampão PBS 1X para uma concentração de  $10^8$  UFC/mL. Esta solução foi inoculada pela técnica de infiltração em cinco folhas de três plantas de limão 'Cravo' e três plantas de laranja 'Pêra Rio' (três réplicas biológicas). A patogenicidade foi avaliada mediante a observação e o registro fotográfico e comparando a ausência ou presença de sintomas do cancro nas diferentes folhas das plantas durante 21 dias. As plantas foram mantidas sob as mesmas condições que as utilizadas para a curva de crescimento *in vivo*.

#### 4.3.10 Ensaio de formação de biofilme

O ensaio foi de formação de biofilme foi realizado segundo Yan e Wang (2011), com algumas modificações. Os isolados de Xac 306 e  $\Delta$ XAC1008 foram crescidos em meio NB e mantidos a 28°C por 48 horas. Em seguida foram ressuspensos em meio de cultura líquido XVM2 (WENGELNIK *et al.*, 1996) até a concentração de  $10^8$  UFC/mL, sendo em seguida diluídos para uma concentração de  $10^6$  UFC/mL. Desta suspensão bacteriana, alíquotas de 1 mL de cada isolado foram transferidas para cinco tubos de ensaio (13 mm) de borosilicato, os quais foram mantidos a 28°C por 48 horas sem agitação. O biofilme formado nos frascos foi visualizado através da coloração com 0,1% de violeta cristal e lavado duas vezes com água ultrapura estéril. O corante restante nas células foi dissolvido em 1 mL de etanol 95% e a quantidade de biofilme formada foi estimada através da absorbância a  $DO_{590nm}$ . Este procedimento foi realizado com uma réplica biológica. A média das cinco repetições técnicas foi utilizada para a comparação da produção de biofilme entre as bactérias.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES *in silico* DA ORF XAC1008

Ao analisar a sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da ORF XAC1008 que estava disponível no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (NCBI Reference Sequence: NC\_003919.1 e GenBank: AAM35891.1, respectivamente), percebeu-se que havia uma discrepância entre a sequência de nucleotídeos e a de aminoácidos. A informação era de que a sequência de nucleotídeos do genoma da Xac que correspondia à ORF XAC1008 compreendia as bases c1163422 a 1162994 (429 pb), sendo que a ORF estava na fita complementar (Figura 7). Por outro lado, a informação era de que a proteína codificada pela ORF XAC1008 possuía 142 aa (Figura 8). A proteína, como esperado, possui uma metionina inicial, mas chamou a atenção o fato da sequência de nucleotídeos não



apresentar um ATG inicial. A tradução desta sequência de nucleotídeos usando as ferramentas ORF Finder (NCBI) ou Translation tool (ExpASy) não originou nenhuma sequência de aminoácidos semelhante à descrita para a XAC1008. Assim, a suspeita foi de que a sequência de nucleotídeos presente no NCBI estava errada ou incompleta. Para testar a hipótese de que estava incompleta, pegou-se a sequência de bases c1163600 a 1162994 do genoma da Xac, ou seja, expandiu-se a região “upstream” ao 5’ da ORF predita. A análise desta sequência usando as ferramentas ORF Finder (NCBI) e Translation tool (ExpASy) mostrou que a mesma codifica uma proteína de 153 aa (Figura 9). A análise da sequência de nucleotídeos que codifica esta proteína de 153 aa, utilizando a ferramenta Blastn do NCBI, revelou que a mesma corresponde aos nucleotídeos 1163455 a 1162994 do genoma da Xac (Figura 10). Um alinhamento entre esta proteína de 153 aa e a de 142 aa presente na anotação do genoma da Xac depositado no NCBI mostrou que as duas sequências são idênticas em 141 aa, sendo que a diferença está na região N-Terminal (Figura 11). Assim, fica claro que houve um erro na predição da ORF XAC1008 quando da anotação do genoma, o qual persiste até o momento. Esta análise permitiu encontrar a sequência correta de nucleotídeos da ORF XAC1008, essencial para a construção do vetor de recombinação homóloga para mutação desta ORF.

```
Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306 complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_003919.1

>gi|21240774:c1163422-1162994 Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306
complete genome
GTGTTGCCCGCAGCCAGCTGCAGATTCGCTGTGTTTGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGCACCAGA
CCTTGCGTGGCCAGCAGGCCGTTGCAGAAGTTGCATTGCGTCGCGCTGGATAGCGGTTTGTGGGGCGACTC
GATGTGCCAGGTGGTCACTGCACGCAAGCAATTCGCGCCGACGATCGTGGCGCCAGGCACGCAGCTGAAG
AACGACGATGCCTGGAACAAGGCTTTGGGCGTGGCACTGGCGGCGCAGCGCAACTGGGCATTGCCGGTTG
GCCAACGCAAGAAATCGTGCCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCG
TAATGCCTATCAGGTGGCCACCATCGGGCGACCACACGTTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCCGCGCAAC
GCGTCCTGA
```

**Figura 7:** Sequência de nucleotídeos da ORF XAC1008, como encontrada no GenBank.

```

Conserved hypothetical protein [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]

GenBank: AAM35891.1

GenPept Identical Proteins Graphics
>gi|21107146|gb|AAM35891.1| conserved hypothetical protein [Xanthomonas
axonopodis pv. citri str. 306]
MLPQPAADSLCLSTTVYLEARDQTLRGQQAFAEVALRRLDGLWGDSMCQVVTARKQFAPTIVAPGTQLK
NDDAWNKALGVALAAQRNWALPVGQRKEIVPGASHFAASAIASPSWRNAYQVATIGDHTFYRVQSLRPRN
AS

```

**Figura 8:** Sequência de aminoácidos da ORF XAC10008, como encontrada no GenBank.

```

Length: 153 aa
Accept Alternative Initiation Codon
146 atgaaactgtttggatactctggctgtcgcgatgtgtgcccgcag
M K L V W I L W L S H V L P Q
191 ccagctgcagattcgtgtgtttgagtaacgacctctatctggaa
P A A D S L C L S T T V Y L E
236 gcgcgcgaccagaccttgcgtggccagcaggccgttgcagaagtt
A R D Q T L R G Q Q A V A E V
281 gcattgcgtgcctggatagcgggtttgtggggcgactcgatgtgc
A L R R L D S G L W G D S M C
326 caggtggtcactgcacgcaagcaattcgcgccgacgatcgtggcg
Q V V T A R K Q F A P T I V A
371 ccaggcagcagctgaagaacgacgatgcctggaacaaggctttg
P G T Q L K N D D A W N K A L
416 ggcgtggcactggcggcgcagcgcgaactgggcattgcccgttggc
G V A L A A Q R N W A L P V G
461 caacgcaaagaaatcgtgcccggcgcagccactttgcccagc
Q R K E I V P G A S H F A A S
506 gcaatcgcgagccctagctggcgtaatgcctatcaggtggccacc
A I A S P S W R N A Y Q V A T
551 atcggcgaccacacgttctatcgcgtgcaatcgcgtgcccgcgc
I G D H T F Y R V Q S L R P R
596 aacgcgtcctga 607
N A S *

```

**Figura 9:** Sequência da proteína encontrada pelo programa ORF Finder na sequência de nucleotídeos c1163600 a 1162994 do genoma da Xac.

Query	1	ATGAAACTTGTTGGATACTCTGGCTGTGCGCATGTGTTGCCCGCAGCCAGCTGCAGATTCG	60
Sbjct	1163455	ATGAAACTTGTTGGATACTCTGGCTGTGCGCATGTGTTGCCCGCAGCCAGCTGCAGATTCG	1163396
Query	61	CTGTGTTTGGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGCGACCAGACCTTGCCTGGCCAGCAG	120
Sbjct	1163395	CTGTGTTTGGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGCGACCAGACCTTGCCTGGCCAGCAG	1163336
Query	121	GCCGTTGCAGAAGTTGCATTCGCTGCGCTGGATAGCGGTTTGTGGGGCGACTCGATGTGC	180
Sbjct	1163335	GCCGTTGCAGAAGTTGCATTCGCTGCGCTGGATAGCGGTTTGTGGGGCGACTCGATGTGC	1163276
Query	181	CAGGTGGTCACTGCACGCAAGCAATTCGCGCCGACGATCGTGGCGCCAGGCACGCAGCTG	240
Sbjct	1163275	CAGGTGGTCACTGCACGCAAGCAATTCGCGCCGACGATCGTGGCGCCAGGCACGCAGCTG	1163216
Query	241	AAGAACGACGATGCCTGGAACAAGGCTTTGGGCGTGGCACTGGCGGCGCAGCGCAACTGG	300
Sbjct	1163215	AAGAACGACGATGCCTGGAACAAGGCTTTGGGCGTGGCACTGGCGGCGCAGCGCAACTGG	1163156
Query	301	GCATTGCCGTTGGCCAACGCAAAGAAATCGTGCCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGC	360
Sbjct	1163155	GCATTGCCGTTGGCCAACGCAAAGAAATCGTGCCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGC	1163096
Query	361	GCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTATCAGGTGGCCACCATCGGCGACCACAG	420
Sbjct	1163095	GCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTATCAGGTGGCCACCATCGGCGACCACAG	1163036
Query	421	TTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCCGCGCAACGCGTCTCTGA	462
Sbjct	1163035	TTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCCGCGCAACGCGTCTCTGA	1162994

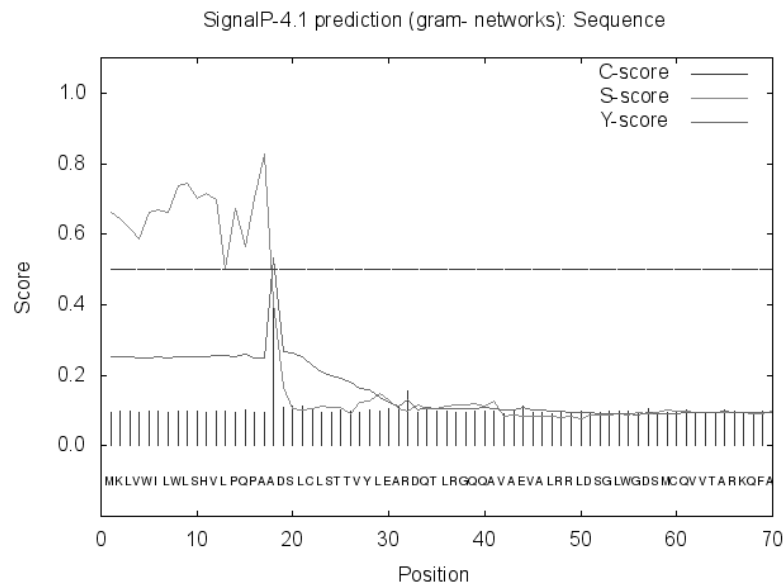
**Figura 10:** Resultado do Blastn da sequência de nucleotídeos, que codifica a nova proteína da ORF XAC1008 (Query), contra a sequência do genoma da Xac (Sbjct).

XAC1008_NCBI			
Sequence ID: lcl Query_1689 Length: 142 Number of Matches: 1			
Query	12	VLPQPAADSLCLSTTVYLEARDQTLRGQQAQVAEVALRRLDSDLWGDSMCQVVTARKQFAP	71
Sbjct	1	MLPQPAADSLCLSTTVYLEARDQTLRGQQAQVAEVALRRLDSDLWGDSMCQVVTARKQFAP	60
Query	72	TIVAPGTQLKNDDAWNKGVALAAQRNWALPVGQRKEIVPGASHFAASAIASPSWRNAY	131
Sbjct	61	TIVAPGTQLKNDDAWNKGVALAAQRNWALPVGQRKEIVPGASHFAASAIASPSWRNAY	120
Query	132	QVATIGDHTFYRVQSLRPRNAS	153
Sbjct	121	QVATIGDHTFYRVQSLRPRNAS	142

**Figura 11:** Resultado do alinhamento entre a sequência da proteína XAC1008 predita pelo ORF Finder no NCBI (Query) e a proteína XAC1008 presente no NCBI (Sbjct).

A análise da sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC1008 no programa SignalP-4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) detectou a presença de um peptídeo sinal nos primeiros 17 aa da região N-terminal da proteína (Figura 12), que é predita ser translocada para o espaço periplásmico

pelo sistema geral de secreção Sec pelo programa Effective (<http://www.effectors.org/>) (Figura 13).



**Figura 12:** Região predita do peptídeo sinal (linha acima do score 0.5) da proteína codificada pela ORF XAC1008.

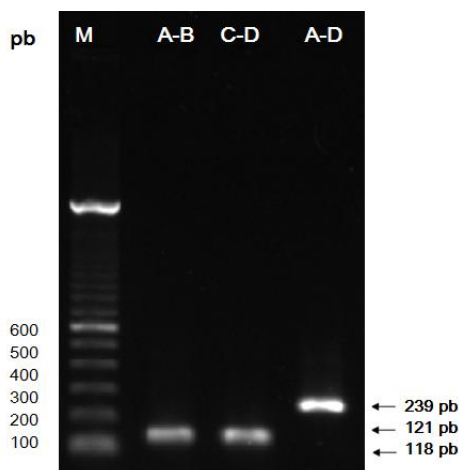
Protein name	Description	is Sec secreted (NN/HMM scores)			is T3 secreted (EffectiveT3 score)		Euk. domains
Query		+	0.45	0.002		0.0007	

**Figura 13:** Predição, pelo programa Effective, da translocação da proteína codificada pela ORF Xac306 para o espaço periplásmico pelo sistema geral de secreção Sec.

## 5.2 Mutação sítio-dirigida da ORF XAC1008

A técnica de deleção sítio-dirigida por PCR, seguida por recombinação homóloga utilizando o vetor suicida pOK1, permitiu a obtenção do mutante  $\Delta$ XAC1008 da estirpe Xac 306, onde a maior parte da sequência que codifica o domínio hidrolase\_2 da proteína XAC1008 foi removida. A Figura 14 mostra os fragmentos AB e CD obtidos na PCR primária e o fragmento AD obtido na PCR de

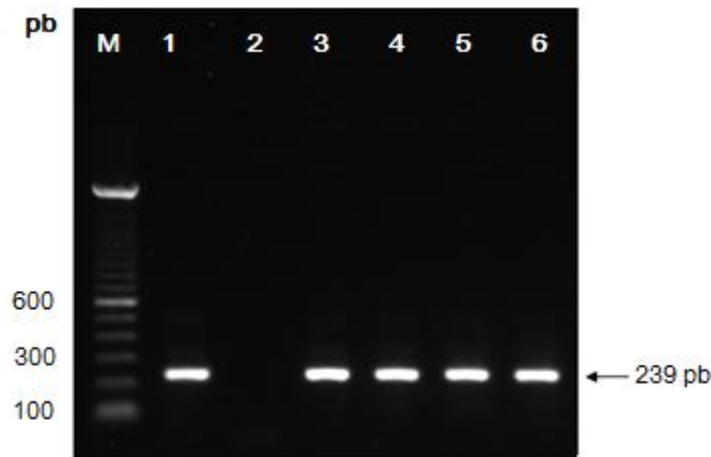
ligação, os quais apresentaram os tamanhos esperados, ou seja, 121 pb para AB, 118 pb para CD e 239 pb para AD.



**Figura 14:** Produtos resultantes da PCR primária e da PCR de ligação da ORF XAC1008 com os primers AB, CD e AD. M: Padrão de peso molecular (100 pb *DNA Ladder*, INVITROGEN). Amplicons das PCRs primárias AB (121 pb) e C-D (118 pb) e da PCR de ligação AD (239 pb). Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (1 µg/mL).

Na clonagem do fragmento AD no vetor pGEM®-T-Easy foram obtidos onze clones, utilizando carbenicilina. O DNA plasmidial dos diferentes clones foi purificado e utilizado como molde para realizar a PCR convencional para verificar a presença do fragmento, sendo que sete clones amplificaram um fragmento do tamanho esperado (239 pb). A confirmação da sequência clonada foi realizada por sequenciamento, o qual mostrou que dois clones tinham a sequência AD sem nenhuma troca, deleção ou inserção de bases. O DNA de um destes clones foi então digerido com as enzimas de restrição *ApaI* e *Sall* e o fragmento de 315 pb contendo a sequência AD flanqueada por sequências do plasmídeo pGEM®-T-Easy foi clonado no vetor suicida pOK1, também digerido com as mesmas enzimas. Após a transformação em *E. coli* SM10  $\lambda$ pir foram obtidos seis clones resistentes ao antibiótico espectinomicina, onde cinco deles continham o fragmento AD clonado, como revelado pela PCR com os oligonucleotídeos A e D (Figura 15). O sequenciamento mostrou que quatro dos cinco clones apresentavam sequência

idêntica à do fragmento AD (Figura 16), enquanto um deles tinha uma deleção, uma inserção e duas trocas de base.



**Figura 15:** Produto de PCR obtido de clones de *E. coli* SM10  $\lambda$ pir transformadas com o vetor suicida pOK1 contendo o fragmento AD clonado. 1 a 6: clones de *E. coli* SM10  $\lambda$ pir resultantes da transformação com o vetor pOK1 contendo o fragmento AD clonado, M: padrão de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Invitrogen™). Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídeo (1  $\mu$ g/mL).

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

XAC1008AD      AGCTGCAGATTCGCTGTGTTTGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGGACCAGACCTT 60
Clone3         AGCTGCAGATTCGCTGTGTTTGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGGACCAGACCTT 60
Clone1         AGCTGCAGATTCGCTGTGTTTGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGGACCAGACCTT 60
Clone4         AGCTGCAGATTCGCTGTGTTTGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGGACCAGACCTT 60
Clone5         AGCTGCAGATTCGCTGTGTTTGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGGACCAGACCTT 60
Clone6         AGCTGCAGATTCGCTGTGTTTGAGTACGACCGTCTATCTGGAAGCGCGGACCAGACCTT 60
*****

XAC1008AD      GCGTGGCCAGCAGGCCGTTGCAGAAATTGCATTGCGTCGCTGGATAGCGGTTTGTGGTG 120
Clone3         GCGTGGCCAGCAGGCCGTTGCAGAAATTGCATTGCGTCGCTGGATAGCGGTTTGTGGTG 120
Clone1         GCGTGGCCAGCAGGCCGTTGCAGAAATTGCATTGCGTCGCTGGATAGCGGTTTGTGGTG 120
Clone4         GCGTGGCCAGCAGGCCGTTGCAGAAATTGCATTGCGTCGCTGGATAGCGGTTTGTGGTG 120
Clone5         GCGTGGCCAGCAGGCCGTTGCAGAAATTGCATTGCGTCGCTGGATAGCGGTTTGTGGTG 120
Clone6         GCGTGGCCAGCAGGCCGTTGCAGAAATTGCATTGCGTCGCTGGATAGCGGTTTGTGGTG 120
*****

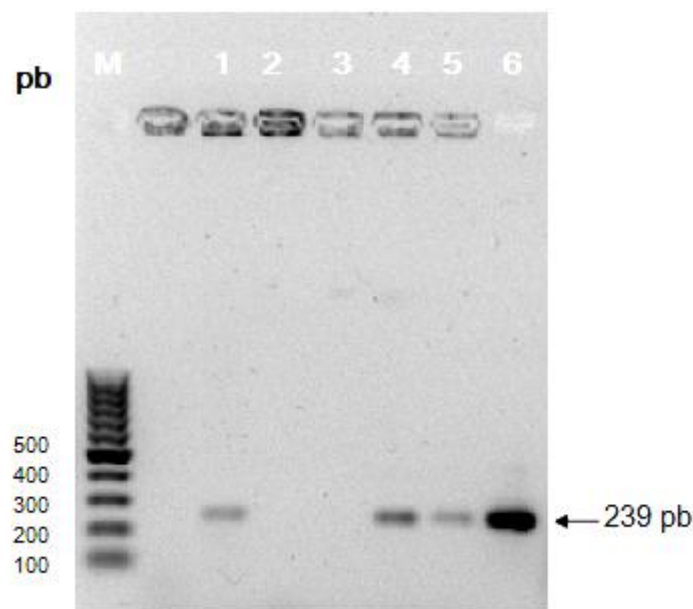
XAC1008AD      CCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTAT 180
Clone3         CCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTAT 180
Clone1         CCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTAT 180
Clone4         CCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTAT 180
Clone5         CCGGGCGCCAGCCACTTTGCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTAT 180
Clone6         CCGGGCGCCCT-CCACTTTGCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTAT 179
*****

XAC1008AD      CAGGTGGCCACCATCG-GCGACCACACGTTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCCGCGCAA 239
Clone3         CAGGTGGCCCTCCATCG-GCGACCACACGTTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCCGCGCAA 239
Clone1         CAGGTGGCCACCATCG-GCGACCACACGTTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCCGCGCAA 239
Clone4         CAGGTGGCCACCATCG-GCGACCACACGTTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCCGCGCAA 239
Clone5         CAGGTGGCCACCATCG-GCGACCACACGTTCTATCGCGTGCAATCGCTGCGCCCGCGCAA 239
Clone6         CAGGTGGCCACCATCGAGCGACCACACGTTCTATCGCGTGCAATCGTTGCGCCCGCGCAA 239
*****

```

**Figura 16:** Alinhamento das sequências dos cinco clones resultantes da transformação de *E. coli* SM10  $\lambda$ pir com o vetor suicida pOK1 contendo o fragmento AD clonado. O algoritmo utilizado foi o ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/>).

O clone 4 foi utilizado para transformar Xac 306, dando origem a seis colônias após a transformação e seleção, das quais três tiveram a presença do fragmento AD confirmado por PCR utilizando o DNA genômico como molde e os oligonucleotídeos A e D (Figura 17). O clone 5 foi sequenciado utilizando DNA genômico como molde e os oligonucleotídeos A e D (Tabela 4). O alinhamento múltiplo das sequências da ORF XAC1008, do fragmento AD e da sequência obtida do clone 5, realizado através do algoritmo ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/>), confirmou a presença da deleção na ORF XAC 1008 do clone 5 (Figura 18). Este clone é, portanto, um mutante por deleção da ORF XAC1008 ( $\Delta$ XAC1008) e foi utilizado nos experimentos de avaliação funcional da ORF.



**Figura 17:** Produtos de PCR obtidos de colônias de Xac 306 transformadas com o vetor suicida pOK1 contendo a sequência AD clonada. 1 a 5: DNA genômico de colônias de Xac 306 após a transformação e seleção, 6: produto da PCR de ligação AD (controle positivo), M: Padrão de peso molecular (GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder, Fermentas).



```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

XAC1008      ATGAAACTTGTTTGGATACTCTGGCTGTCGCATGTGTTGCCGCGAGCCAGCTGCAGATTGG 60
XAC1008AD    -----AGCTGCAGATTGG 13
M5          -----TGTATACTTG 10
              * * * * *

XAC1008      CTGTGTTTGGAG-----TACGACCGTCTATCTGGAGCG-----CGCGACCAGACCTTG 108
XAC1008AD    CTGTGTTTGGAG-----TACGACCGTCTATCTGGAGCG-----CGCGACCAGACCTTG 61
M5          GTGTTTCATGAGGGTTCTTACGACATTCTTCCTTGAGGTGGAGTTACGTCATTGGACATCA 70
              * * * * *

XAC1008      CGTGGCCAGCAGGCCG-TTGCAGAAGTTGCATTGCGTTCGCTGGATAGCGGTTTGTGGGG 167
XAC1008AD    CGTGGCCAGCAGGCCG-TTGCAGAAGTTGCATTGCGTTCGCTGGATAGCGGTTTGTGG-- 118
M5          GGTTCCTGTAAGGTGATTGGGGAATGTAAGGGG---CTAGAAAGGTGTGAATGCA- 125
              * * * * *

XAC1008      CGACTCGATGTGCCAGGTGGTCACTGCACGCAAGCAATTGCGCCGACGATCGTGGCGCC 227
XAC1008AD    -----
M5          -----

XAC1008      AGGCACGCGAGCTGAAGAACGACGATGCTTGAACAAGGCTTTGGGCGTGGCACTGGCGGC 287
XAC1008AD    -----
M5          -----

XAC1008      GCAGCGCAACTGGGCATTGCCGGTTGGCCAAACGCAAGAAATCGTGCCGGGCGCCAGCCA 347
XAC1008AD    -----TSCGGGCGCCAGCCA 134
M5          -----ACAGGGCAT-GTTCA 139
              * * * * *

XAC1008      CTTTCCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTATCAGGTGGCC-ACCA 406
XAC1008AD    CTTTCCCGCCAGCGCAATCGCGAGCCCTAGCTGGCGTAATGCCTATCAGGTGGCC-ACCA 193
M5          TTATCCAAGGGATACGTTAATATGGTCC-GCTCCCG-AAT--CTTTCTGGAGGCTATCA 195
              * * * * *

XAC1008      TCGGCGACC--ACACGTTCTAT-CGCGT---GCAATCG---CTGCGCCCGCGCAACGCG 456
XAC1008AD    TCGGCGACC--ACACGTTCTAT-CGCGT---GCAATCG---CTGCGCCCGCGCAA----- 239
M5          TACCAATCTAATTTGTTTTTGTATGTTGAAGCAATCGGACCTTCATCGACTAAAATAA 255
              * * * * *

XAC1008      TCCTGA 462
XAC1008AD    -----
M5          -----

```

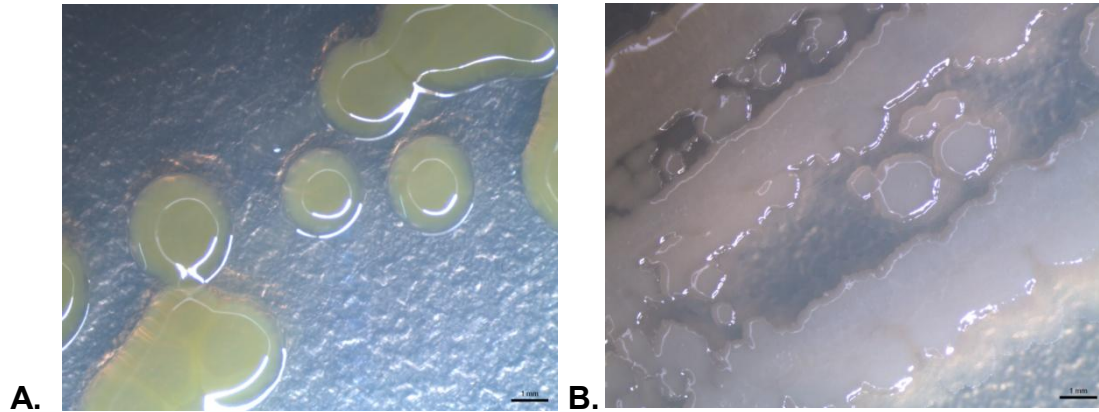
**Figura 18:** Alinhamento das sequências da ORF XAC1008 não mutada, do fragmento AD e do clone 5 resultante da transformação de Xac 306 com o vetor suicida pOK1 contendo a sequência AD clonada. O algoritmo utilizado foi o ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/>). A região tracejada entre as 125 pb e 331 pb em comparação a XAC 1008 corresponde à sequência deletada.

### 5.3 Curvas de crescimento e teste de patogenicidade

As colônias de Xac com o gene mutado da ORF XAC1008 (mutante  $\Delta$ XAC1008) apresentaram um fenótipo diferente da Xac 306 selvagem. Em meio NA as colônias do mutante  $\Delta$ XAC1008 apresentam uma coloração esbranquiçada, de borda irregular, com elevação, superfície lisa e aspecto viscoso e o crescimento pôde ser observado depois de 24 horas em estufa a 28°C (Figura 19B). Por outro lado, as colônias da Xac 306 selvagem apresentam coloração amarela, borda



circular, com elevação, superfície lisa e aspecto viscoso e crescem após 49-72 horas em estufa a 28°C (Figura 19A).

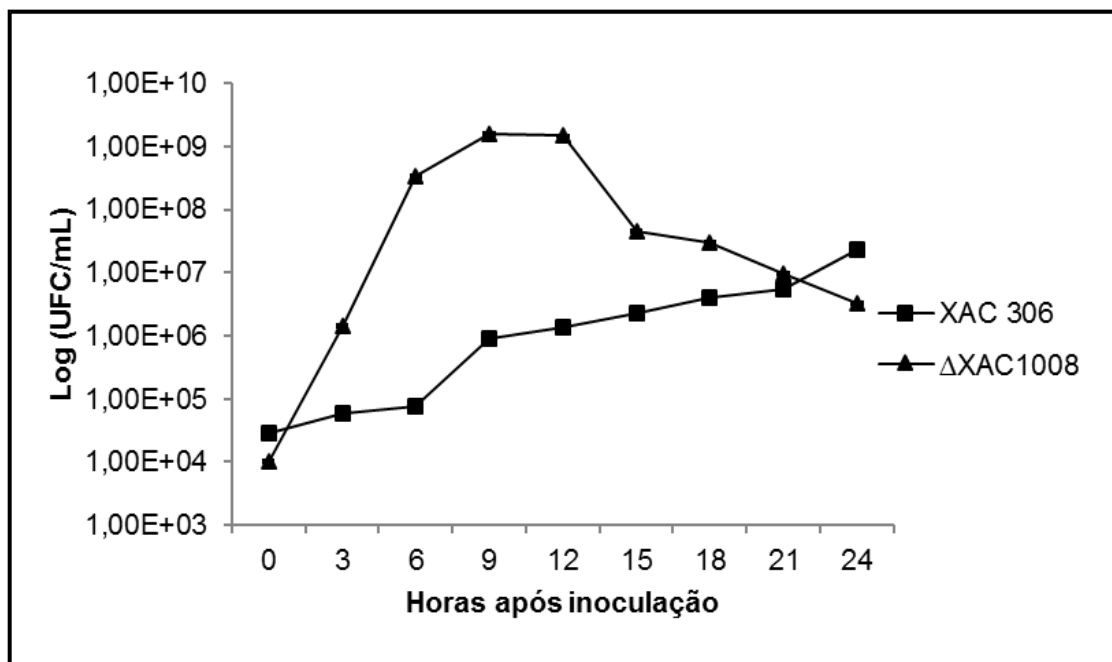


**Figura 19:** Fotografias das colônias das estirpes de Xac 306 (A) e do mutante  $\Delta$ XAC1008 (B) após incubação a 28 °C durante 72 horas em meio NA. As imagens foram obtidas com a lupa Leica MZ75 e editadas com o programa IM50 a escala de 1 mm (linha preta).

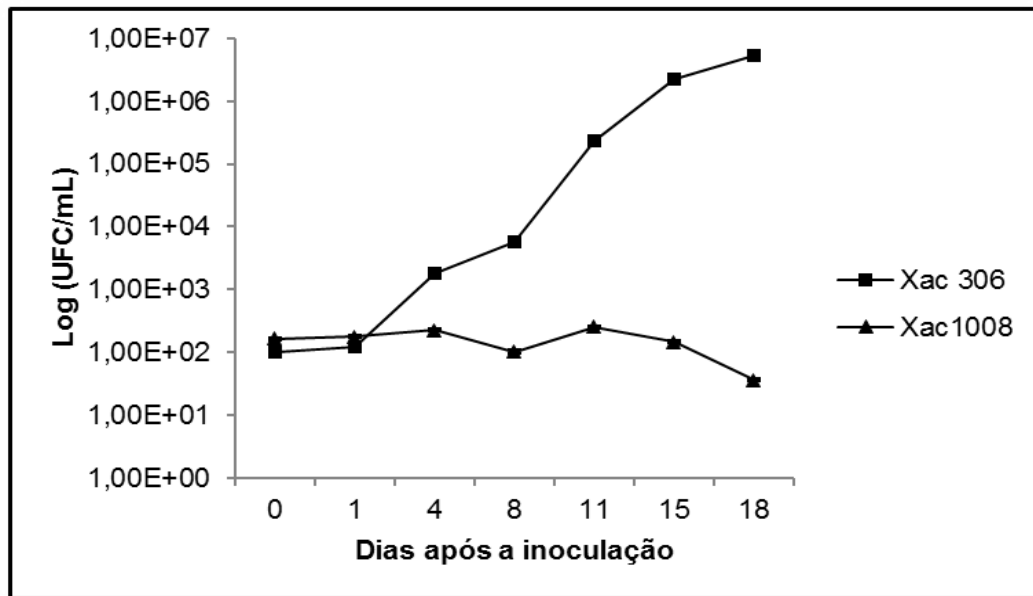
As características de multiplicação *in vitro* entre a bactéria mutada e a selvagem foi avaliada pela curva de crescimento em meio NB durante 24 horas de incubação a 28°C (Figura 20). Claramente o mutante  $\Delta$ XAC1008 se multiplica muito mais rápido do que a Xac 306 selvagem nas primeiras 12 horas (1.000 vezes mais; 1,00E+9 para 1,00E+6). O mutante  $\Delta$ XAC1008 atinge a fase log após 3 horas, com o crescimento das células ocorrendo até às 6 horas após a inoculação, quando então entra em fase estacionária até às 12 horas, após o que entra em declínio, que representa a morte das células até às 24 horas. Por outro lado, a Xac 306 apresenta uma fase lag até 6 horas, quando então começa a se multiplicar, porém em uma velocidade muito menor do que a do mutante  $\Delta$ XAC1008, ainda que continue crescendo até 24 horas, quando o mutante já está morrendo. Este crescimento rápido do mutante seguido de declínio (morte das células) pode ser uma consequência da ausência da proteína XAC1008 no periplasma das células. Onde seria responsável por alguma função importante desempenhada pela parede celular da Xac ligada à multiplicação e sobrevivência da bactéria.

Em contraste, o crescimento *in planta* em limão ‘Cravo’ mostrou que o mutante  $\Delta$ XAC1008 foi incapaz de se multiplicar, sendo que o número de bactérias se manteve constante até o 11º dia e depois começou a diminuir, indicando morte

das bactérias (Figura 21). A Xac 306 selvagem, entretanto, foi capaz de se multiplicar na planta, apresentando uma fase de adaptação de 24 horas e um crescimento exponencial entre os dias 4 a 11, quando então entrou em fase estacionária. Durante os 18 dias de crescimento, a concentração de Xac 306 selvagem nas folhas passou de  $1,00E+02$  para  $1,00E+07$ . Portanto, parece que a ausência da proteína XAC1008 no mutante  $\Delta XAC1008$  impede a multiplicação e sobrevivência da bactéria no hospedeiro citros.



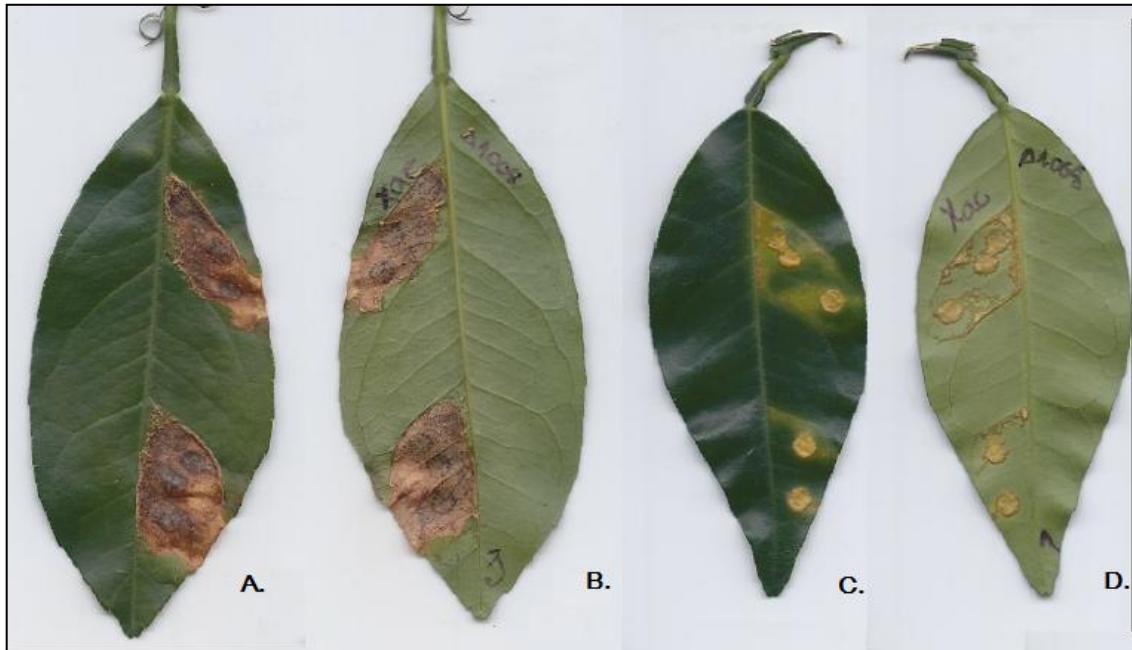
**Figura 20:** Curva de crescimento *in vitro* da estirpe selvagem Xac 306 e do mutante  $\Delta XAC1008$  em meio NB durante 24 horas.



**Figura 21:** Curva de crescimento *in vivo* comparando as bactérias Xac 306 e o mutante  $\Delta$ XAC1008 quando inoculadas em folhas de limão 'Cravo'.

No teste de patogenicidade em limão 'Cravo' e laranja Pêra, o mutante  $\Delta$ XAC1008 não causou nenhum sintoma de cancro cítrico mesmo após 21 dias de inoculação, mostrando-se completamente avirulento, sem ocasionar também nenhuma reação de hipersensibilidade (Figura 22). Por outro lado, a Xac 306 selvagem causou os sintomas típicos de cancro cítrico tanto em limão 'Cravo' como em laranja Pêra, que foram mais severos em limão 'Cravo' (mais suscetível) do que em laranja Pêra (mais tolerante) (Figura 22). Este resultado, associado com a não multiplicação do mutante na planta, sugere que a proteína XAC1008 não é um fator de virulência ou de patogenicidade, mas sim uma proteína essencial para a sobrevivência da Xac no apoplasto do hospedeiro citros. Ferreira (2009), utilizando inserção aleatória por transposon Tn5, obteve um mutante para a ORF XAC1008. Este mutante, quando inoculado em folhas de laranja 'Pêra Rio' causou hiperplasia, mas não necrose e, quando inoculado em limão 'Cravo', diminuiu a hiperplasia e não causou necrose. Esta diferença de comportamento entre os dois mutantes pode ser devido ao método utilizado nos dois casos. O nosso mutante foi obtido por deleção da região central do domínio hidrolase\_2 da proteína XAC1008. O mutante obtido por Ferreira (2009) contém uma inserção do transposon Tn5; entretanto, não é mencionado o local de inserção do transposon. Em nenhum dos dois casos foi feita a

complementação do mutante para verificar se a reintrodução do gene reverte o fenótipo. Estudos adicionais precisam ser realizados para investigar a diferença de fenótipo entre os dois mutantes.

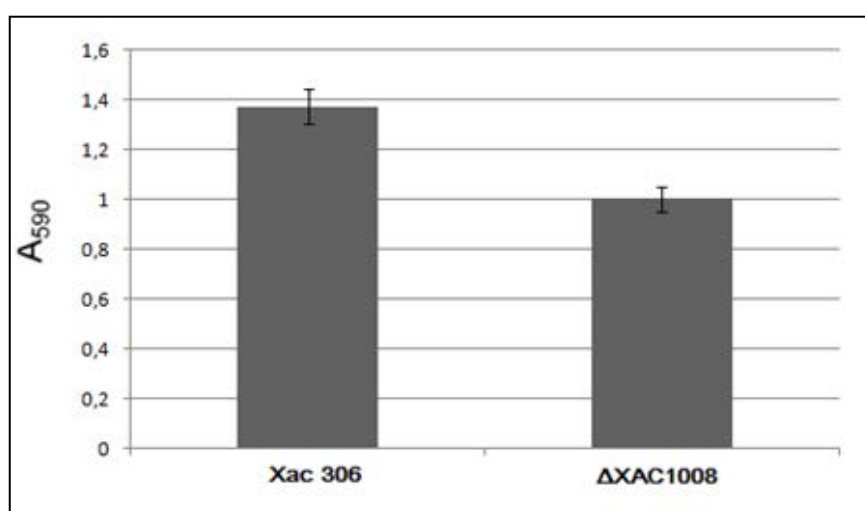


**Figura 22:** Sintomas observados após 21 dias da inoculação das bactérias Xac 306 selvagem e do mutante  $\Delta$ XAC1008 em folhas de limão 'Cravo' (A e B) e laranja Pêra (C e D). As faces adaxiais estão representadas nas figuras A e C, e as faces abaxiais estão representadas nas figuras B e D. A estirpe selvagem Xac 306 foi inoculada do lado esquerdo da nervura central, e o mutante  $\Delta$ XAC1008 foi inoculado do lado direito da face abaxial.

#### 5.4 Teste de produção de biofilme

A produção de biofilme é uma característica associada à virulência em diferentes bactérias patogênicas, incluindo a Xac (HUANG *et al.*, 2013; LI.; WANG, 2014). A produção de biofilme foi menor no mutante  $\Delta$ XAC1008 quando comparada com a da XAC 306 selvagem (Figura 23). Para permitir a comparação dos dados foram estabelecidas duas hipóteses, uma hipótese nula ( $H_0$ ) e uma alternativa ( $H_1$ ). A hipótese nula ( $H_0$ ) foi que o valor das médias seria similar para as duas bactérias, enquanto que a hipótese alternativa ( $H_1$ ) foi que seria diferente. A análise pelo teste T de Student usando  $\alpha = 0,05$  e 1 gl, mostrou que o T calculado (3,45) foi menor ao T teórico (12,7), o que indica que a hipótese nula foi rejeitada e a hipótese alternativa

foi aceita, ou seja, o valor das médias é significativamente diferente em relação à produção de biofilme quando comparada Xac selvagem e o mutante  $\Delta XAC1008$ . É sabido que bactérias que se encontram em um meio rico em nutrientes não tem a necessidade de agrupar-se, mas o meio XVM2 que foi utilizado no experimento para avaliar a produção de biofilme é um meio indutor da expressão de genes do sistema de secreção tipo III e, portanto é de se supor que simula o ambiente interno do apoplasto das plantas (WENGELNIK *et al.*, 1996; HUECK, 1998), onde a formação de biofilme é indispensável para a adesão da Xac e posterior colonização no hospedeiro citros (FERREIRA *et al.*, 2015). Assim, a diferença significativa de produção de biofilme entre as bactérias, ajudaria a explicar, entre outros fatores, por que o mutante  $\Delta XAC1008$  não apresentou multiplicação e colonização dos hospedeiros citros no teste de patogenicidade e na curva de crescimento *in planta*.



**Figura 23:** Formação de biofilme pelas bactérias Xac 306 selvagem e mutante  $\Delta XAC1008$ . Os tubos representam uma amostra das cinco repetições técnicas da primeira repetição biológica. Os valores do gráfico representam a média das dez réplicas, com o respectivo desvio padrão.

A co-evolução das plantas e dos seus agentes patogênicos deu origem a diversas estratégias de ataque-contra-ataque. A primeira barreira enfrentada pelos patógenos de plantas é a parede da célula hospedeira rígida e quimicamente complexa. A capacidade de secretar enzimas hidrolíticas específicas para quebrar diferentes componentes da parede da célula da planta é uma das principais características de virulência de fungos e bactérias fitopatogênicos. As celulases,

xilanases, poligalacturonases, e pectato liases são as responsáveis por degradar os principais constituintes de polissacarídeos das paredes celulares das plantas, que fornecem um ponto de entrada para o patógeno e induzem as respostas de defesa da planta. Uma destas enzimas, denominada LipA, é uma proteína com atividade enzimática, com uma função lipase/esterase descrita em *Xanthomonas oryzae* e estimada como conservada para o gênero *Xanthomonas* (APARNA, *et al.*, 2009).

Até o momento não se tem conhecimento em *Xanthomonas* de estudos de caracterização funcional de proteínas da parede celular com domínio hidrolase similar à da proteína codificada pela ORF XAC1008 em Xac, mas sim em outras bactérias como *Bacillus* e *Streptomyces coelicolor*. Utilizando o programa Predict Protein (<https://www.predictprotein.org/>), foram identificados genes com domínios relacionados, os quais já foram caracterizados, permitindo realizar uma comparação entre eles e a XAC1008 para estabelecer sua possível função. Estes estudos, focados no gene *sleB*, que codifica uma amidase específica de germinação de em *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*, que hidrolisa o córtex dos esporos *in situ* durante a germinação. Em estudos experimentais do gene *SleB* de *Bacillus*, a função da proteína por ele codificada, que também possui um domínio hidrolase\_2 similar àquele presente na ORF XAC1008, está relacionada com os processos de degradação de peptidoglicano durante o processo de divisão celular e com o processo de germinação e estrutura de esporos após do período de latência (ISHIKAWA; YAMANE; SEKIGUCHI, 1998; BOLAND, *et al.*, 2000; HEFFRON *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2012), o que mostrou a importância desta enzima na hidrólise do peptidoglicano da parede celular.

Outro estudo, realizado por Haiser *et al.* (2009) em *Streptomyces coelicolor* usando mutantes, mostrou que as proteínas codificadas por genes de parede celular com domínio hidrolase, denominados *RpfA*, *SwIA*, *SwIB*, e *SwIC*, confirmadas como enzimas hidrolíticas, podiam se ligar de forma eficiente à parede celular e hidrolisar o peptidoglicano. Os mutantes destes genes apresentaram defeito na formação de esporos, alteração no crescimento vegetativo ou atraso na germinação dos esporos, mostrando assim a importância da atividade de hidrolase na remodelação da parede celular desta bactéria.

Os resultados obtidos para o mutante  $\Delta$ XAC1008 indicam claramente que a proteína codificada pela ORF XAC1008 é essencial para a sobrevivência e multiplicação da Xac no hospedeiro citros. As análises *in silico* e analogia com a função de outras proteínas de bactéria que possuem o domínio hidrolase\_2 funcional sugerem que a proteína XAC1008 pode estar envolvida no processo de divisão celular da Xac. A sua ausência também interfere com a formação de biofilme, componente importante para a virulência das bactérias patogênicas. Entretanto, a real função desta proteína em Xac ainda precisa ser confirmada. A sua expressão em Xac na forma de proteína de fusão com GFP pode confirmar a sua localização no periplasma, enquanto a sua expressão heteróloga em *E. coli*, seguida de purificação e estudos bioquímicos, pode revelar se o domínio hidrolase\_2 é funcional e seu real substrato *in vivo*.

## 6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que a proteína codificada pela ORF XAC1008 é essencial para a sobrevivência e multiplicação da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) no seu hospedeiro citros. O nocaute da ORF faz com que a bactéria apresente diferença na coloração e no formato das colônias, não se multiplique em limão 'Cravo', não cause cancro em laranja 'Pêra Rio' e em limão 'Cravo', dois de seus hospedeiros citros, e diminua de maneira significativa a formação de biofilme. Análises no Pfam e COG sugerem que, em outras bactérias, o domínio hidrolase\_2 está presente em proteínas envolvidas na divisão celular. Entretanto, o papel exato da proteína XAC1008 em Xac ainda precisa ser determinado.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A caracterização da proteína XAC 1008 (codificada pela ORF XAC1008), essencial para que se conheça a sua função em Xac, envolve necessariamente a sua obtenção na forma de proteína recombinante. Durante o desenvolvimento deste trabalho fomos capazes de demonstrar que a mesma é expressa em *E. coli* quando

clonada no sistema de expressão Champion™ pET SUMO Protein (Invitrogen) como descrito no anexo 1. Neste sistema ela é expressa na forma de proteína de fusão His-SUMO-XAC1008, podendo ser liberada da cauda His-SUMO por clivagem com a SUMO protease e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>2+</sup>-Sepharose. Uma vez construído o vetor de expressão e mostrado que o mesmo é capaz de induzir a expressão da proteína de fusão em *E. coli*, faz-se necessário estabelecer as condições para expressar a proteína recombinante na forma solúvel e sua purificação. Uma vez obtida a proteína recombinante XAC1008, será possível então realizar a sua análise funcional através da caracterização bioquímica de sua atividade amidásica ou peptidásica frente a diferentes substratos e, de esta maneira, determinar a sua função em Xac.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Clonagem da ORF XAC1008 por meio de clonagem no vetor Champion™ pET SUMO Protein Expression System (Invitrogen)

O cassete para a expressão da proteína XAC1008 em *E. coli* na forma de proteína de fusão His-SUMO-XAC1008 foi obtido a partir da clonagem da ORF XAC1008 no vetor Champion™ pET SUMO Protein Expression System (Invitrogen™). Para tanto, o fragmento de DNA correspondente à ORF XAC1008 que foi isolado a partir do cosmídeo 1DD01-LSWRIST4. Uma alçada do clone de *E. coli* DH10B contendo o cosmídeo 1DD01-LSWRIST4 em meio LB sólido com o antibiótico de seleção canamicina (50 µg/mL) e mantida por 12 horas, a 37°C. Posteriormente, uma colônia isolada foi coletada e transferida para um tubo tipo Falcon de 50 mL, contendo 3 mL de meio LB líquido com o antibiótico canamicina (50 µg/mL) e mantido por 16 horas, a 37°C sob agitação a 200 rpm. Após a multiplicação, o DNA cosmidial foi purificado através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e pureza do DNA obtido foram estimadas com o *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific).



A partir do DNA plasmidial purificado, a ORF XAC1008 foi amplificada mediante reações de PCR com volume final de 20  $\mu\text{L}$  através do kit *Thermo Scientific Phusion High-fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific). Para tanto, foram utilizados 4  $\mu\text{L}$  de 5X *Phusion GC buffer*, 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTP's (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  a 10 mM de cada oligonucleotídeo F\_1 e R (Tabela 4), 1  $\mu\text{L}$  DNA (10 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0,6  $\mu\text{L}$  de DMSO, 0,2  $\mu\text{L}$  de *Taq Phusion DNA Polymerase* e 11,8  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril. Para a amplificação do produto foram aplicados os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 98°C durante 1 min, 25 ciclos de desnaturação a 98°C durante 15 seg, anelamento a 63°C durante 15 seg e extensão a 72°C por 30 seg. Após o último ciclo, foi realizada uma extensão final de 10 min a 72°C. Para conferir a amplificação do fragmento de interesse, foi preparado como descrito anteriormente nos materiais e métodos, um gel de agarose 1,0% (m/v).

Antes da clonagem no vetor de expressão pET SUMO foi necessária a adição de um mononucleotídeo de adenina (A) nas extremidades 5' do produto de DNA da PCR, uma vez que o vetor pET SUMO é um vetor que tem um mononucleotídeo de Timina (T) nas suas extremidades 3' abertas. A adição do mononucleotídeo de adenina foi realizada através da adição de 1  $\mu\text{L}$  de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™) e extensão a 72°C por 10 min em termociclador. Posteriormente, foi realizada a reação de ligação em vetor *Champion™ pET SUMO Protein Expression System* (Invitrogen™) através da adição de 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase, 1  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 10 X, 1  $\mu\text{L}$  de vetor pET SUMO (25 ng/ $\mu\text{L}$ ), 1,5  $\mu\text{L}$  do produto de PCR e 5,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, em um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . A reação de ligação foi realizada em termociclador a 16 °C por 16 horas.

Esta reação de ligação foi utilizada como descrito anteriormente para transformar células quimicamente competentes de *E. coli* DH10B. A partir de colônias isoladas foram preparadas culturas em 5 mL de meio LB contendo canamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) para a purificação do DNA plasmidial e amplificação do fragmento de interesse por PCR utilizando os oligonucleotídeos F\_1 e R (Tabela 4). O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e a identidade do DNA clonado no vetor pET SUMO foi verificada por sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos SUMO-F (AGATTCTTGTACGACGGTATTAG) e T7-R (TAGTTATTGCTCAGCGGTGG).

## 9. REFERÊNCIAS

- AGUSTÍ, M. **Fruticultura**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2004. Cap. 14, 314 p.
- APARNA, G.; CHATTERJEE, A.; SONTI, R.; SANKARANARAYANAN, R. A cell wall-degrading esterase of *xanthomonas oryzae* requires a unique substrate recognition module for pathogenesis on rice. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 6, p. 1860–1873, 2009.
- ARNOLD, D. L.; JACKSON, R. W.; WATERFIELD, N. R.; MANSFIELD, J. W. Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. **Trends in Genetics**, Kidlington, v. 23, n. 6, p. 293–300, 2007.
- AMARAL, S. F. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 112-123, 1957.
- AZEVEDO, M.; FELIPE, M.; BRÍGIDO, M. Técnicas básicas em biologia molecular. Brasília: UNB, 2003.
- BELASQUE, JÚNIOR, J.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; RIBEIRO, L. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; AMORIM, L. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, Piracicaba, v. 30, n. 4, p. 387-393, 2005.
- BEHLAU, F.; BELASQUE JÚNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; LEITE JUNIOR, R. P. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. **Fitopatologia Brasileira**, Piracicaba, v. 32, n. 4, p. 311-317, 2007.
- BEHLAU F.; BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; GRAHAM, J. H.; LEITE JUNIOR, P.; GOTTWALD, T. R. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on Young orange trees in southern Brazil. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 807–813, 2008.
- BOLAND, M.; ATRIH, A.; CHIRAKKAL, H.; FOSTER, SIMON.; MOIR, A. Complete spore-cortex hydrolysis during germination of *Bacillus subtilis* 168 requires SleB and YpeB. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 57–64, 2000. pt. 1.
- CHAGAS, M.; PARRA, J.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J.; YAMAMOTO P. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000100009>>. Acesso em: 09 set. 2015.
- COLETTA-FILHO, H. D.; TAKITA, M.; DE SOUZA, A.; NETO, R.; DESTEFANO, L.; HARTUNG, J.; MACHADO, M. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v.100, n. 2, p.

279-285, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2005.02787.x/abstract>>. Acesso em: 09 set. 2015.

DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS JR; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, R. C.; FERRO, M. I.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G.; LEMOS, M. V.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, n. 6887, p.459-463, 2002.

DELANEY TP. Genetic dissection of acquired resistance to disease. **Plant Physiology**, Rockville, v.13, p.5-12, 1997.

DE SÁ, A.; DE OLIVEIRA, G.; DE JESUS, F.; NOTINI, M.; VENDEMIATTI, E.; PINTO, M.; BORDIGNON, S. Uso de mutantes e transgênicos de tomateiro no estudo de fisiologia vegetal. In: I workshop de ciências da APG/ESALQ. Piracicaba: ESALQ/USP, 2015. **Anais do i workshop de ciências da apg/esalq: “o despertar profissional”**. Disponível em: <[http://www.apgesalq.org.br/foto\\_arquivos\\_paginas/ANAIS\\_WORKSHOP\\_CIENCIA\\_S\\_APG\\_FINAL.pdf](http://www.apgesalq.org.br/foto_arquivos_paginas/ANAIS_WORKSHOP_CIENCIA_S_APG_FINAL.pdf)>. Acesso em: 17 mar. 2015.

Do AMARAL, A. O que torna o cancro cítrico uma doença? Artigo técnico. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, n.2, p.375-387, 2004.

FERREIRA, R.; DE OLIVEIRA, A.C.P.; MOREIRA, L.M.; BELASQUE JUNIOR, J.; GOURBEYRE, E.; SIGUIER, P.; FERRO, M.I.T.; FERRO, J.A.; CHANDLER, M.; VARANI, A.M. A TALE of transposition: Tn3-like transposons play a major role in the spread of pathogenicity determinants of *Xanthomonas citri* and other xanthomonads. **mBio**, Washington, D.C., v. 6, 2015.

FINN, R.D.; BATEMAN, A.; CLEMENTS, J.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R.Y.; EDDY, S.R.; HEGER, A.; HETHERINGTON, K.; HOLM, L.; MISTRY, J.; SONNHAMMER, E.; TATE, J.; PUNTA, M. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.41, p.1-9, 2013.

FRIRDICH, E.; GAYNOR, C. Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, Kidlington, v.16, n.6, p.767-778, 2013.

FUNDECITRUS- Fundo da Defesa da Citricultura. **Especial Cancro cítrico**. Citricultor. Ano VI abril de 2014. Disponível em: <[www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)>. Acesso em: 13 nov. 2014.

FUNDECITRUS. Fundo da Defesa da Citricultura. **Doenças, Cancro cítrico**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>>. Acesso em: 23 mai. 2015.

FUNDECITRUS. Fundo da Defesa da Citricultura. **Estimativa da safra de laranja 2015/16 do cinturão citrícola de são paulo e triângulo/sudoeste mineiro cenário em maio/2015**. Araraquara, São Paulo, 2015b. Disponível em: <[www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)>. Acesso em: 5 jul. 2015.

FUNDECITRUS. Fundo da Defesa da Citricultura. **Inventário de árvores do cinturão citrícola de são paulo e triângulo/sudoeste mineiro – retrato dos pomares em março/2015**. Araraquara, São Paulo, 2015c. Disponível em: <[www.fundecitrus.com.br](http://www.fundecitrus.com.br)>. Acesso em: 5 jul. 2015.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, Chichester, v.5, n. 1, p. 1–15, 2004.

GOTTWALD TR.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: The pathogen and its impact. **Online Plant Health Progress**, St, Paul, 2002.

HASSE, G. **A laranja no Brasil 1500-1987: A história da agroindústria cítrica Brasileira, dos quintais colônias às fábricas exportadora de suco no século XX**. São Paulo: Coopercitrus Industrial Frutesp S.A. DUPRAT E IOBE, 1987.

HAISER, H.; YOUSEF, M.; ELLIOT, A. Cell Wall Hydrolases Affect Germination, Vegetative Growth, and Sporulation in *Streptomyces coelicolor*†. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 191, n, 21, p. 6501–6512, 2009.

HEFFRON, J.; ORSBURN B.; POPHAM D. Roles of Germination-Specific Lytic Enzymes CwlJ and SleB in *Bacillus anthracis*†. American Society for Microbiology. **Journal of bacteriology**, Washington, v.191, n. 7, p.2237–2247, 2009.

HUANG, T. P.; LU, K. M.; CHEN, Y. H. A Novel Two-Component Response Regulator Links rpf with Biofilm Formation and Virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Plos one**, San Francisco, v. 8, n.4, 2013.

ICA. Boletín Epidemiológico. **Situación actual de HLB (huanglonbing) y su vector el Psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri* kuwayama) en Colombia**. Instituto Colombiano Agropecuario ICA, 2010. Disponível em: <[http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-agricola/BOLETINES/Nacionales/2010/BN\\_Diaphorina\\_2010.aspx](http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Epidemiologia-agricola/BOLETINES/Nacionales/2010/BN_Diaphorina_2010.aspx)>. Acesso em: 20 mai. 2015.

ISHIKAWA, S.; YAMANE, K.; SEKIGUCHI, J. Regulation and Characterization of a Newly Deduced Cell Wall Hydrolase Gene (*cwlJ*) Which Affects Germination of *Bacillus subtilis* Spores. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 180, n. 6, p. 1375–1380, 1998.

KOORNNEEF, A.; LEON-REYES, A.; RITSEMA, T.; VERHAGE, A.; OTTER, F.C..D.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. **Plant Physiology**, Rockville, v.147, n. 3, p.1358-1368, 2008.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. I. T.; SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. F. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, London, v. 9, n. 12, p.1-17, 2009.

LARANJEIRA, F. Quantificação de danos causados por doenças em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, Embrapa: CNPAF, 2006, p.147-163. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 144).

LEE, J.; SHIN, M.; RYU, D.; KIM, S.; RYU, W. Insertion and Deletion Mutagenesis by Overlap Extension PCR. In: BRAMAN J. **In Vitro Mutagenesis Protocols**. 3. ed. New York, 2010. Cap 10, p.137-146.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 6ª Ed. 2014.

LI, Y.; JIN K.; SETLOW, B.; SETOLW, P.; HAO, B. Crystal Structure of the Catalytic Domain of the *Bacillus cereus* SleB Protein , Important in Cortex Peptidoglycan Degradation during Spore Germination. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n. 17, p. 4537-4545, 2012.

LU, H.; PATIL, P.; VAN SLUYS, M .A.; WHITE, F. F.; RYAN, R. P.; DOW, J. M.; RABINOWICZ, P.; SALZBERG, S. L.; LEACH, J. E.; SONTI, R.; BRENDEL, V.; BOGDANOVE, A. J. Acquisition and Evolution of Plant Pathogenesis–Associated Gene Clusters and Candidate Determinants of Tissue-Specificity in *Xanthomonas*. **Plos one**, San Francisco, v. 3, n.11, 2008.

MACHADO M. **Análise funcional dos genes *exsF* E *exsG* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

MADRIZ, K. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v. 63, p.22-32, 2002.

MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Citrus**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>> Acesso em: 29 mai. 2015.

MATTOS, J. R. D.; QUAGGIO, J.; BOARETTO, R. Uso de elicitores para defesa em plantas cítricas. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.65-74, 2010.

MOHAMMADI, M.; MIRZAEI, M. R.; RAHIMI, H. Physiological and biochemical characteristics of Iranian strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 49, n.2, p.65-75, 2001.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA JR., N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DE MORAES, F. E.; DE OLIVEIRA, J. C.; DE SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE JR., R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; RODRIGUES NETO, J.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA JR., H. A.; STASKAWICZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A.; SETUBAL, J. C. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, London, v. 11, artigo 238, 2010.

NEVES, M. F. (Org.). **O retrato da Citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138p. Disponível em: <[http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato\\_Citricultura\\_Brasileira\\_Marcos\\_Fava.pdf](http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf)> Acesso em: 29 mai. 2015.

OECD-FAO. **Perspectivas Agrícolas 2015**. Disponível em: <[http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2015/summary/spanish\\_eafacee1-es](http://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2015/summary/spanish_eafacee1-es)> Acesso em: 18 jul. 2015

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, V.; DA ROCHA, P. **Cultivares de laranja resistentes ao cancro cítrico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Embrapa: CNPAF, 2008, 31 p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 249). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/746885>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, V.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; NAKASU, B.H. **Manual técnico sobre o cancro cítrico**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Embrapa: CNPAF, 2008, 24 p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 234). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/746695/1/documento234.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

POLEK, M.; VIDALAKIS, G.; GODFREY, K. Citrus bacterial canker disease and Huanglongbing (Citrus Greening). **University of California. Division of agriculture and natural resources**. Publication 8218, 2007.

RAJAGOPAL, I.; SUNDARI, C. S.; BALASUBRAMANIAN, D.; SONTI, R. V. The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 415, n. 2, p.125 – 128, 1997.

REYMOND, P.; FARMER, E. Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. **Current Opinion in Plant Biology**, Kidlington, v. 1, n. 5, p.104-411, 1998.

RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, J. G. B. **Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico**. Brasília: MAPA/SDA/DDIV, 2002, 66p.

RYAN, R.; VORHÖLTER, F.; POTNIS, N.; JONES, J.; VAN SLUYS, M.; BOGDANOVA, A.; MAXWELL, J. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature reviews Microbiology**, London, v. 9, p.345-355, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, v. 3, 1989.

SANCHES, A.; DE MIRANDA S.; BELASQUE JR.; BASSANEZI, B. Análise Econômica da Prevenção e Controle do Cancro Cítrico no Estado de São Paulo. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 52, n. 03, p.549-566, 2014.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. 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. rev.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* Silva et al. 92 jb (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Berlin, v. 28, p.494-518, 2005.

SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, p. 1–17, 1993.

SOUZA, E.C. **Análise da expressão gênica global em mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

TIMMER, L.; GARNSEY, S.; GRAHAM, J. **Compendium of citrus diseases**. 2<sup>nd</sup> ed St. Paul NM: APS Press, 2000. p.5–7.

TRIVEDI, P.; WANG, N. Host immune responses accelerate pathogen evolution. SHORT COMMUNICATION. **The ISME Journal**, London, v. 8, p.727-731, 2013.

WALTERS, D. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 28, n. 6, p.459-465, 2009.

WYCKOFF, J. T.; TAYLOR A. J.; SALAMA, R. N. Beyond growth: novel functions for bacterial cell wall hydrolases. **Trends in Microbiology**, Kidlington, v. 20, n. 11, 2012.