

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

**MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA ORF XAC0024 DE
Xanthomonas citri subsp. *citri* E SUAS IMPLICAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO DO CANCRO CÍTRICO**

Tháisa Zanetoni Martins

Bióloga

2016

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

**MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA ORF XAC0024 DE
Xanthomonas citri subsp. *citri* E SUAS IMPLICAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO DO CANCRO CÍTRICO**

Tháísa Zanetoni Martins

**Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro
Coorientadora: Dra. Helen Alves Penha**

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

2016

M386m Martins, Thaísa Zanetoni
Mutagênese sítio-dirigida da ORF XAC0024 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e suas implicações no desenvolvimento do cancro cítrico / Thaísa Zanetoni Martins. -- Jaboticabal, 2016
ix, 82 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: Jesus Aparecido Ferro
Co-orientadora: Helen Alves Penha
Banca examinadora: Flávia Maria de Souza Carvalho, Fabricio José Jaciani
Bibliografia

1. Virulência. 2. Peptidase_M23. 3. Biofilme. 4. Goma xantana. 5. Interação planta-patógeno. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Tháisa Zanetoni Martins, brasileira, solteira, nascida em Santa Fé do Sul – SP, em 17 de setembro de 1987. Filha de Edimundo dos Santos Martins e Sueli Munhoz Zanetoni Martins. Concluiu o Ensino Médio no COC em 2004. Formou-se na escola de inglês FISK – English Courses, Adamantina – SP e participou de cursos de informática básica e avançada. Em 2006 iniciou a Graduação em Ciências Biológicas Licenciatura Plena pela Faculdades Adamantinenses Integradas – FAI, tendo concluído em 2009. Em 2007 começou seu primeiro estágio remunerado no Laboratório de Controle Biológico da broca da cana-de-açúcar na empresa Bioenergia do Brasil S.A., Lucélia – SP, tendo finalizado em 2008. Em 2010 iniciou a Pós-graduação Lato Sensu em Microbiologia junto à Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente – SP, tendo concluído em 2011. Em 2012 estagiou no Laboratório de Análises Clínicas Biomed, em Guararapes – SP, e ingressou e concluiu o curso profissionalizante de Auxiliar de Laboratório de Análises Clínicas junto ao Projeta Cursos Profissionalizantes em São José do Rio Preto – SP. Em agosto de 2013 ingressou no mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal) – SP, com auxílio financeiro da CAPES, sob orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e coorientação da Dra. Helen Alves Penha, onde desenvolveu pesquisas relacionadas com a avaliação de sintomas e características de um mutante para uma proteína do patógeno do cancro cítrico, resultando no presente trabalho. Durante sua vida acadêmica, atuou como sócia e secretária do “LEO Clube” (afiliado ao LIONS Clube), uma organização não governamental que presta serviços desinteressadamente à comunidade; participou da organização do X Fórum de Microbiologia da FCAV/UNESP e participou do VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada – ENAP, UFRGS, Porto Alegre – RS, no qual expôs em *banner* seu atual trabalho de mestrado.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, não conhecem nem vitória, nem derrota. Você pode dormir até mais tarde e ter muitos sonhos, porém se acordar mais cedo pode realizá-los, de que lado você gostaria de estar?”

Dedico com amor este trabalho,

Primeiramente a Deus, porque tem sido tudo em minha vida.

Ao meu pai Edimundo, por ter me ensinado e sempre frisado que o estudo é o melhor caminho que poderá me levar a vitórias. Sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

À minha mãe Sueli, por sonhar os meus sonhos, pelas orações, cuidado e dedicação constante todos os dias. Seu amor e apoio foram fundamentais na realização deste projeto.

Às minhas irmãs Camila e Jaqueline, pelo amor e carinho demonstrado em minha vida, por torcerem por mim e compartilharem seus sonhos e objetivos de vida.

Aos meus avós Josepha, Helena e Armando, pela transparência do amor por mim, por terem me ensinado o bom caráter e pelos momentos alegres que tive ao lado de vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Por ter convertido o meu coração ao evangelho, dando sabedoria para os momentos de decisão, tranquilidade para os dias de tensão e paz acima das circunstâncias. Por ter sido meu maior companheiro durante todas as etapas deste trabalho e me revelado que realmente tudo é possível àquele que crê. A Ele entrego todo o meu mérito.

Aos meus pais Edimundo e Sueli, pelo amor, incentivo, compreensão, suporte por meio de orações, palavras de sabedoria, força e carinho que me sustentaram e me mantiveram prosseguindo rumo ao alvo. Às minhas irmãs Jaqueline e Camila, pelo carinho e apoio constantes, pela preocupação com meu bem estar, pelas confidências trocadas e pelos momentos de descontração. Por fim, a todos os meus parentes que entenderam minha ausência em muitas confraternizações e torceram por mim.

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela orientação, sugestões, broncas e paciência durante esses quase três anos. Pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, pelas correções do mesmo e confiança a mim atribuída. Foi uma grande oportunidade para meu crescimento profissional estar sob a orientação de um excelente profissional que genuinamente tem paixão pela ciência.

À Dra. Helen Alves Penha, pela coorientação, ensinamentos, conselhos e amizade. Por ter me dado forças, acreditar em meu potencial e evolução no decorrer deste trabalho. Acredito que boa parte do meu amadurecimento pessoal e profissional foi graças a você. É uma pessoa a quem eu admiro muito, me espelho e tenho como exemplo profissional.

À Profa. Maria Inês, pelo acolhimento ao grupo LBM, conselhos, apoio e disposição em sempre ajudar, além do suporte financeiro dispensado neste projeto. Agradeço também em especial pela estima e desejo de que eu fizesse parte do conselho do programa de Microbiologia Agropecuária como representante discente, ajudando a tornar esse fato real.

Aos Professores Daniel Guariz Pinheiro e Alessandro de Mello Varani por disporem parte de seu tempo com dicas e conselhos na realização de análises e na elaboração de estratégias para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas especiais de trabalho Elkin Fernando Rodas e Angela Rocio Nino Santisteban, por serem os primeiros a me acolher no laboratório e terem feito parte do meu crescimento profissional. Agradeço pela ajuda no trabalho em bancada, pelos puxões de orelha, conselhos, experiências trocadas, companheirismo, rizadas, incentivos, enfim, por estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Aos colegas do LBM Aline (Belesini), Aline (Lopes), Amanda, Ana Carolina, Bruna, Claudenia, Daniele, Elaine, Flávia (Campos), Flávia (Carvalho), Janaína, Juan, Juliana, Julie, Karina, Larissa, Maria Lucília, Michelle, Rafael, Raquel, Sonia e Tamiris porque todos, em algum momento, tiveram sua participação neste trabalho seja com sugestões, palavras de incentivo, dúvidas sanadas, auxílio em experimentos, momentos de descontração, enfim, pelo amizade e excelente relação.

Às meninas do CREBIO, Agda, Mariza e Renata pelo suporte que deram em muitas etapas experimentais, pela disponibilidade e o ótimo convívio com vocês.

Às amigas de república Amanda, Dayse, Lara e Luciana pelo agradável convívio, amizade, por entender os meus momentos de altos e baixos e por serem parte da minha família em Jaboticabal.

À uma grande amiga conquistada no início do mestrado, Raissa Massareli, porque com você tem sido cultivada uma amizade além do ambiente de trabalho. O companheirismo e a sua alegria me deram outro ânimo para o dia-a-dia. Você se mostrou verdadeira amiga através de pequenos gestos de carinho, apoio e consolo nos momentos de resultados negativos e muito parceira para celebrar, badalar, dar boas e altas risadas e fiel nos inúmeros momentos de gordices. Sei que sua amizade me acompanhará por muitos anos ainda.

Às amigas de longa data, Évelin, Fabiula, Daiane e Léia, que mesmo a distância, me lembravam de quanto eu era querida por ligações e mensagens. Agradeço pela amizade leal e por compreenderem minha fase de intensa dedicação ao estudo científico, pelo qual não pude muitas vezes dar a devida atenção que mereciam.

Aos membros da Igreja Redenção, em especial ao Pastor Gideoni Moraes, um grande servo de Deus que tem o dom de transformar corações por meio da palavra de Deus. Agradeço por ter aliviado meu coração nos dias de angústia e renovado minha fé diante dos obstáculos que enfrentei durante o mestrado. Devo em grande parte a ti, todo o meu crescimento interior e a conversão ao evangelho.

Às irmãs de coração da Igreja Redenção Camila, Vanessa e Angela, pelas orações e amizade sincera desenvolvida durante minha permanência em Jaboticabal. Afinidade não se define, tampouco se explica! Obrigada por fazerem dos meus dias aqui mais especiais!

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| CERTIFICADO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA..... | iii |
| RESUMO..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| LISTA DE FIGURAS..... | vi |
| LISTA DE TABELAS..... | ix |
| | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 2.1 O contexto histórico e importância da citricultura no Brasil..... | 4 |
| 2.2 Cancro cítrico, sintomatologia e disseminação da doença..... | 7 |
| 2.3 Espécies de <i>Xanthomonas</i> e suas características..... | 11 |
| 2.4 Sequenciamento do genoma de Xac e o interesse na ORF XAC0024...12 | 12 |
| 2.5 Mutação sítio-dirigida e recombinação homóloga em Xac..... | 16 |
| 3 OBJETIVOS..... | 20 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 20 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 20 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 21 |
| 4.1 Obtenção do DNA da ORF XAC0024..... | 21 |
| 4.2 Mutação sítio-dirigida da ORF XAC0024..... | 21 |
| 4.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos..... | 21 |
| 4.2.2 Obtenção dos fragmentos A-B, C-D e A-D por PCR..... | 23 |
| 4.2.3 Clonagem em vetor pGEM [®] -T Easy e transformação em <i>E. coli</i> DH10B quimicamente competente..... | 24 |
| 4.2.4 Sequenciamento do fragmento A-D clonado no vetor pGEM [®] -T Easy..... | 26 |
| 4.2.5 Digestão do vetor pGEM [®] -T Easy com o inserto A-D..... | 27 |
| 4.2.6 Clonagem em vetor suicida pOK1 e transformação em <i>E. coli</i> SM10 λpir quimicamente competente..... | 28 |
| 4.2.7 Transformação em células eletrocompetentes de Xac..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 4.2.8 Seleção e confirmação dos mutantes..... | 31 |
| 4.2.9 Confirmação da identidade da Xac mutada..... | 32 |
| 4.3 Teste de patogenicidade em limão cravo (<i>Citrus limonia</i> Osbeck)..... | 34 |
| 4.4 Curva de crescimento bacteriano <i>in vitro</i> | 35 |
| 4.5 Curva de crescimento bacteriano <i>in vivo</i> | 36 |
| 4.6 Ensaio de autoagregação..... | 37 |
| 4.7 Ensaio de formação de biofilme..... | 37 |
| 4.8 Extração e quantificação de goma xantana..... | 38 |
| 4.9 Análise da frequência e diversidade da ORF XAC0024 presente nos bancos de dados..... | 39 |
| 5 RESULTADOS..... | 40 |
| 5.1 Mutação sítio-dirigida da ORF XAC0024..... | 40 |
| 5.2 Ensaio de patogenicidade em limão cravo (<i>Citrus limonia</i> Osbek)..... | 45 |
| 5.3 Crescimento bacteriano <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 47 |
| 5.4 Ensaio de agregação célula a célula..... | 48 |
| 5.5 Formação de biofilme..... | 49 |
| 5.6 Produção de goma xantana..... | 50 |
| 5.7 Análise da frequência e diversidade da ORF XAC0024 presente nos bancos de dados..... | 51 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 53 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 67 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 68 |

MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA DA ORF XAC0024 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* E SUAS IMPLICAÇÕES NO DESENVOLVIMENTO DO CANCRO CÍTRICO

RESUMO – O cancro cítrico tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), que afeta diferentes espécies de citros economicamente importantes. É uma doença ainda sem método curativo, e pela sua relevância e dano econômico, faz-se necessário o entendimento em termos moleculares da interação Xac-citros para o desenvolvimento de estratégias que controlem a doença. O objetivo do presente trabalho foi investigar os efeitos da deleção da ORF XAC0024 presente no genoma da Xac isolado 306, que codifica uma proteína hipotética conservada e que apresenta vários domínios putativos, entre eles o domínio peptidase M23. A hipótese é que esta proteína pode estar envolvida com a patogenicidade e/ou virulência da bactéria. Para obter o mutante Δ XAC0024 foi utilizada a técnica de mutagênese sítio-dirigida, seguida de recombinação homóloga com o vetor suicida pOK1. O mutante Δ XAC0024 foi analisado em relação às características de patogenicidade, crescimento *in vivo* e *in vitro*, capacidade de autoagregação, produção de biofilme e produção de goma xantana. O teste de patogenicidade e a curva de crescimento *in vivo* foram realizados em limão cravo utilizando o método de infiltração por seringa para a inoculação da bactéria. Os sintomas do desenvolvimento da doença foram registrados por fotografia digital até o 25º dia após a inoculação (dai) e a curva de crescimento *in vivo* também foi determinada até o 25º dai. A curva de crescimento *in vitro* e a agregação célula-a-célula foram analisadas em meio de cultura líquido NB. O ensaio de produção de biofilme foi feito em meio de cultura líquido XVM2 em superfície abiótica empregando cristal violeta para sua visualização e espectrofotometria para sua quantificação. A extração da goma xantana foi realizada por meio da precipitação com isopropanol após dissolução de KCl em meio goma com as bactérias multiplicadas em 96 horas. Verificou-se que o mutante Δ XAC0024 foi menos virulento em relação à Xac selvagem e que o seu desenvolvimento *in planta* é limitado; porém, em meio nutritivo NB apresenta crescimento similar à Xac selvagem. O mutante Δ XAC0024 apresentou ainda maior formação de goma xantana, diminuição na capacidade de se autoagregar e inalterabilidade na formação de biofilme em relação à Xac selvagem. Essa é a primeira evidência de que a ORF XAC0024 interfere na virulência da bactéria, afeta a produção de goma xantana e a agregação celular de Xac 306. A hipótese é de que a proteína codificada pela ORF XAC0024 participe do sistema de degradação do peptidoglicano na divisão celular em Xac, sendo que experimentos adicionais são necessários para confirmar esta hipótese.

Palavras-chave: virulência, peptidase_M23, biofilme, goma xantana, interação planta-patógeno

***Xanthomonas citri* subsp. *citri* ORF XAC0024 SITE-DIRECTED MUTAGENESIS AND ITS IMPLICATIONS IN CITRUS CANCKER DEVELOPMENT**

ABSTRACT – The bacteria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) is the causal agent of citrus canker, a disease that affects different species of economically important citrus. There is no a curative method for this disease, and do to its relevance and economic damage, it is necessary to understand at molecular level the Xac-citrus interaction in order to develop strategies to control the disease. The objective of this study was to investigate the effects of the deletion of the ORF XAC0024 present in the genome of Xac strain 306, which encodes a conserved hypothetical protein and has several putative domains, including peptidase M23 domain. It is hypothesized that this protein may be involved in the pathogenicity and / or virulence of the bacterium. For the Δ XAC0024 mutant was used for site-directed mutagenesis technique, followed by homologous recombination with the suicide vector pOK1. The Δ XAC0024 mutant was analyzed in relation to pathogenicity characteristics, growth *in vivo* and *in vitro*, self-aggregation capacity, biofilm production and production of xanthan gum. The pathogenicity test and *in vivo* growth curves were performed on Rangpur lime using syringe-infiltration method for the inoculation of bacteria. Symptoms of the disease development were recorded by digital photography to the 25° day after inoculation (dai) and *in vivo* growth curve was also determined to give the 25°. The growth curve *in vitro* and cell-to-cell aggregation were analyzed in liquid culture medium NB. Biofilm production test was done in a liquid culture medium XVM2 on abiotic surface using crystal violet for your viewing and spectrophotometry for its quantification. The extraction of xanthan gum was performed by isopropanol precipitation after dissolving KCl among gum with bacteria grown in 96 hours. It was found that the Δ XAC0024 mutant was less virulent compared to the wild Xac and its development *in planta* is limited; however, in nutrient medium NB presents similar growth to the wild Xac. The Δ XAC0024 mutant also showed increased formation of xanthan gum, decreased ability to self-aggregation and inviolability in biofilm formation compared to wild Xac. This is the first evidence that ORF XAC0024 interfere with bacterial virulence affects the production of xanthan gum and cell aggregation Xac 306. The hypothesis is that the protein encoded by ORF XAC0024 participate in the peptidoglycan degradation in division system cell in Xac, and further experiments are needed to confirm this hypothesis.

Keywords: virulence, peptidase_M23, biofilm, xanthan gum, plant-pathogen interaction

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Sintomas característicos do cancro cítrico tipo A em frutos (A e F), folhas (B e E) e ramos (C e D). Podem-se observar lesões de cancro rodeadas por halos cloróticos e erupções em folhas, ramos e frutos. Fontes: FUNDECITRUS, 2016 e “The American Phytopathological Society”. Fonte: <http://www.apsnet.org/publications/Pages/default.aspx>.....**8**
- Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* saindo pelo estômato de uma folha de *C. paradisi* que foi inoculada com a bactéria (GRAHAM et al., 2004).....**9**
- Figura 3.** Microscopia eletrônica de transmissão da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, onde é possível observar a presença do flagelo único (MOREIRA et al., 2010).....**11**
- Figura 4.** Resultado da busca de presença de peptídeo sinal na ORF XAC0024 no programa *SignalP 4.1 Server* (PETERSEN et al., 2011). O programa prediz um peptídeo sinal formado pelos primeiros 20 aminoácidos, com sítio de clivagem entre os aminoácidos 20 e 21.....**15**
- Figura 5.** Arquivo de saída da análise da ORF XAC0024 pelo “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Nele estão preditos a localização das superfamílias Peptidase_M23 e DUF1003 e dos multidomínios EnvC, PRK11637, SMC_prok_B e APG6 ao longo da sequência de 411 aminoácidos da ORF.....**16**
- Figura 6.** Modelo esquemático da mutação sítio-dirigida por deleção, adaptado de Lee e colaboradores (2004). No primeiro passo, denominado de PCR primária, são utilizados dois pares de oligonucleotídeos (“a” com “b”) e (“c” com “d”) para gerar os fragmentos A-B e C-D. No segundo passo, denominado de PCR de ligação, utiliza-se os pares de oligonucleotídeos (“a” com “d”) e obtém-se o produto AD, que é uma versão curta do gene (fragmento mutado). A região sombreada em azul pertence ao segmento deletado.....**18**
- Figura 7.** Mapa do vetor suicida pOK1.....**19**

Figura 8. Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC0024 presente no banco de dados *Genbank* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas em cinza, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. As setas pretas indicam a direção de amplificação dos oligonucleotídeos, as letras destacadas em vermelho no início da ORF (extremidade 5') indicam as bases que codificam o peptídeo sinal e as letras sublinhadas correspondem à região em que as caudas complementares se ligarão por complementariedade.....**23**

Figura 9. Diagrama esquemático da ORF XAC0024, mostrando a região de deleção com os respectivos fragmentos de DNA A-B e C-D que, quando unidos, formam o fragmento A-D.....**40**

Figura 10. Produtos resultantes das PCRs primárias (A-B e C-D) e de ligação (A-D). M: Padrão de peso molecular (“GeneRuler™ 1kb DNA Ladder”, Fermentas). Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (10 mg/mL).....**41**

Figura 11. Géis de eletroforese em agarose. (A) Vetor pGEM-T Easy digerido com as enzimas de restrição *Apal* e *SalI*-HF. 1, 2, 3, 4: “Pull” de um dos clones obtido após a transformação, contendo o fragmento A-D clonado e dividido em quatro poços no gel de agarose. M: Padrão de peso molecular (“GeneRuler™ 1kb DNA Ladder”, Fermentas). (B) Produtos de PCR do fragmento A-D clonado em pOK1 transformado em *E. coli* SM10 λ pir. 1, 2: Clones diferentes obtidos após a transformação e contendo o fragmento A-D clonado. M: Padrão de peso molecular (“GeneRuler™ 1kb DNA Ladder”, Fermentas).....**42**

Figura 12. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos em formato FASTA da ORF XAC0024 completa presente no *Genbank*, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A sequência de nucleotídeos compreendida entre os oligonucleotídeos B (amarelo) e C (azul) foi deletada.....**43**

Figura 13. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos em formato FASTA da ORF XAC0024 truncada. A sequência da proteína codificada pela ORF truncada foi obtida utilizando o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). A ausência do domínio peptidase M23 na proteína codificada pela ORF truncada foi verificada utilizando o algoritmo blastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).....**44**

Figura 14. Teste de patogenicidade. Sintomas observados no 1°, 3°, 7°, 11°, 15°, 19° e 25° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens Xac 306 selvagem e mutante Δ XAC0024 na superfície adaxial (folhas superiores no quadro) e abaxial (folhas inferiores no quadro) de folhas jovens de limão cravo. As duas linhagens bacterianas foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC/mL.....**46**

Figura 15. (A) Curva de crescimento *in vivo* das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem e do mutante Δ XAC0024 em folhas de *Citrus limonia*. (B) Curva de crescimento *in vitro* das mesmas linhagens, porém, inoculadas em meio de cultura líquido NB.....**47**

- Figura 16.** Ensaio de agregação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e do mutante Δ XAC0024 no período de 12 horas.....48
- Figura 17.** Ensaio de agregação do isolado selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (S1, S2 e S3) e do mutante desta linhagem Δ XAC0024 (M1, M2 e M3) após 12 horas em repouso. Cada linhagem está exibida em triplicata.....49
- Figura 18.** Formação de biofilme pelas linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem e mutante Δ XAC0024 em tubos de vidro tipo borossilicato. O experimento foi realizado com cinco replicatas e os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão.....49
- Figura 19.** (A) Concentração de biomassa e goma, em g/L, produzida por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e pelo mutante Δ XAC0024. (B) Relação de goma/biomassa em cada linhagem bacteriana.....50
- Figura 20.** Árvore filogenética do Domínio Bacteria. Os círculos pretos indicam os filós de bactérias cujas proteínas apresentaram similaridade com a proteína XAC0024. Fonte: (MADIGAN et al., 2010).....51

LISTA DE TABELAS

Página

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante da ORF XAC0024, os quais foram desenhados manualmente a partir de sua própria sequência..... | 22 |
|---|-----------|

1. INTRODUÇÃO

A citricultura contribui enormemente para a economia mundial, com uma estimativa de mais de 10 bilhões de dólares por ano. No Brasil, é um dos setores mais competitivos do agronegócio. O progresso da citricultura brasileira é surpreendente. O país detém atualmente mais da metade da produção mundial de suco de laranja e exporta 98% da sua produção. Ademais, a presença acentuada do suco de laranja brasileiro no comércio internacional é motivo de orgulho e enaltece o Brasil no mundo (NEVES et al., 2010).

Mais que uma bebida, o suco da laranja tem sido um amigo da humanidade. No período das grandes navegações marítimas, o escorbuto era uma doença que afetava marinheiros carentes da vitamina C, e a fruta se tornou “garota-propaganda” no combate a esta moléstia. De acordo com pesquisadores, vem dessa época a fama da fruta como fonte de saúde (CITRUS BR, 2016). No entanto, a citricultura sempre foi ameaçada por problemas iminentes, incluindo pragas, doenças e problemas climáticos que limitaram a expansão da indústria e afetou a qualidade e quantidade da produção de citros. O cancro cítrico bacteriano é uma das doenças mais devastadoras dos citrinos (GRAHAM et al., 2004).

O cancro cítrico é causado pela bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), que afeta todas as variedades comerciais de citros, sendo algumas mais suscetíveis que outras. A bactéria penetra no tecido da planta por meio de estômatos ou feridas, invadindo o espaço apoplástico de folhas, ramos e frutos, causando sintomas patológicos como lesões circulares, corticosas e salientes, que se manifestam de uma semana a dois meses após a infecção. A formação de tecido hiperplástico é a manifestação característica para o diagnóstico desta doença.

O agente patogênico se dispersa para outras plantas por meio de vários fatores, estando entre eles a chuva, o vento e a ação humana. Em plantas com altas taxas de infecção e/ou hospedeiros mais susceptíveis ocorre desfolha prematura e queda de frutos. Com a depreciação da qualidade dos frutos, a produção diminui. Sendo esta uma doença quarentenária nos principais países produtores de citros,

limitações foram estabelecidas pelo comércio mundial para importação de frutas cítricas provenientes de países ou regiões com cancro cítrico (MASSARI; BELASQUE-JÚNIOR, 2006; LAIA et al., 2009; FERREIRA, 2009).

Não existe um controle eficiente para a doença até o momento. A eliminação da planta contaminada e a pulverização com cobre das demais amenizam os sintomas nas plantas e reduz as perdas na produção; porém, a inspeção ainda é considerada a melhor medida para manter os pomares livres desse mal (FUNDECITRUS, 2013). Em vista disso, com a sucessiva ocorrência do cancro cítrico, a carência de procedimentos eficazes no seu controle e a ausência de espécies de citros resistentes à doença, a tecnologia do DNA recombinante surgiu como um caminho promissor para acelerar a elucidação e a compreensão dos mecanismos de patogenicidade a nível molecular, como a identificação de efetores de virulência e sinalizadores para o início do processo de infecção, (NELSON; COX, 2002).

Devido à importância econômica da doença, o genoma do isolado 306 de Xac foi completamente sequenciado por Da Silva e colaboradores (2002), possibilitando, assim, a realização de estudos de genômica funcional com vistas ao entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na interação Xac-citros. Dentre as abordagens que podem ser utilizadas está a mutagênese sítio-dirigida, que pode suprimir genes de interesse utilizando a estratégia de recombinação homóloga através de um plasmídeo suicida (KANIGA; DELOR; CORNELIS, 1991). Uma outra abordagem é a mutagênese aleatória, técnica esta que utiliza-se de transposon para gerar bibliotecas de mutantes que permite identificar, por exemplo, genes relacionados com a virulência e/ou patogenicidade (YAN; WANG, 2012; LI; WANG, 2011a; GUO et al., 2010).

Laia et al. (2009) produziu uma biblioteca com cerca de 10.000 mutantes da linhagem selvagem de Xac, isolado 306, por meio da inserção aleatória do transposon EZ-Tn5. Entre os mutantes produzidos, alguns apresentaram alteração no padrão de virulência e/ou patogenicidade, que variaram desde a diminuição dos sintomas até a ausência completa dos mesmos. Dentre os genes que se mostraram envolvidos com a virulência e/ou patogenicidade foram encontrados alguns cuja função ainda não é conhecida (ORFs hipotéticas). Uma das ORFs hipotéticas

mutadas foi a XAC0024. Entretanto, para o mutante desta ORF não foi feita a descrição do fenótipo, provavelmente porque houve reversão para o fenótipo selvagem. A proteína codificada por esta ORF possui, como principal característica, um domínio Peptidase M23, cujo processo biológico é de proteólise e é encontrado em metalopeptidases de zinco ligadas à membrana (OKUMURA et al., 2013). Adicionalmente possui outros domínios relacionados com a divisão celular (MARCHLER-BAUER et al., 2015).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi produzir um mutante para a ORF XAC0024, através da técnica de mutação sítio-dirigida por deleção e recombinação homóloga, e avaliação funcional do mutante com vistas a determinar se a mesma está envolvida com a patogenicidade de Xac.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O contexto histórico e importância da citricultura no Brasil

Os registros disponíveis apontam que a origem das plantas cítricas advém do continente asiático e ilhas adjacentes, que são regiões tropicais e subtropicais de clima úmido. Mais especificamente, estudos demonstram que as laranjas tiveram origem no sul asiático, provavelmente na China, há mais de quatro milênios. O comércio e as guerras entre as nações possibilitaram a expansão do cultivo das frutas cítricas e, com isso, a laranja foi levada para a Europa pelos árabes na Idade Média (NEVES et al., 2010).

No Brasil, as frutas cítricas foram introduzidas pelos colonizadores europeus, tendo seu início de produção, possivelmente, na Bahia. Por ser um país tropical, de clima quente e úmido, a laranja encontrou aqui melhores condições para se desenvolver e produzir do que nas próprias regiões de origem, expandindo-se por todo território nacional. Por volta de 1920, no interior de São Paulo, começou a se estruturar o cinturão citrícola, surgindo os primeiros esboços de uma indústria processadora de suco, nos arredores da cidade de Limeira (RODRIGUEZ et al., 1991).

A boa qualidade da laranja, devido às condições climáticas, propiciou o aumento contínuo da produção, dando condições para que, a partir da década de 1920, fosse possível a exportação de frutas cítricas para a Argentina e, em 1930, para a Europa, exportando-se cerca de meio milhão de caixas de laranja. Aos poucos, a região nordeste do estado de São Paulo se consolidou como grande produtora de laranjas no país (RODRIGUEZ et al., 1991).

Com o surgimento da 2ª Guerra Mundial e de uma doença até então desconhecida, nomeada como “tristeza” dos citros, 80% das árvores cítricas nacionais foram abolidas, levando a uma estagnação comercial que durou cerca de 10 anos. Mais doenças de citros foram surgindo nas décadas seguintes, com merecido destaque para o cancro cítrico. Em 1957 esta doença ocasionou a erradicação de mais de 300 mil árvores nos territórios comprometidos, o que levou à

implementação do programa regional e, em seguida, nacional de erradicação da doença (RODRIGUEZ et al., 1991; NEVES, 1995).

Após esse período conturbado, a citricultura paulista sobressaiu-se na década de 1960, sendo um marco no perfil da citricultura brasileira mudando, desde então, o foco comercial de fruta fresca para a produção de matéria-prima voltada à indústria, consolidando São Paulo como o maior polo citrícola nacional e mundial (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Em 1977, ocorreu a criação do FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura), órgão responsável por obter e aplicar recursos financeiros para o desenvolvimento do setor citrícola (RODRIGUEZ et al., 1991; NEVES, 1995).

Na década de 80, o Brasil consolidou-se como o maior produtor mundial de laranja, diante de uma indústria extremamente desenvolvida e competitiva. Os fatores que contribuíram para esse grande crescimento foram: o custo de produção competitivo, a pesquisa e tecnologia de ponta, o produto com qualidade excelente e a eficiência na logística. Dessa forma, a citricultura paulista, diante de um mercado com preços do suco e da fruta bastante elevados devido às geadas na Flórida, seu forte concorrente, ganhou força a cada safra e, mesmo diante da recuperação produtiva nos pomares da Flórida, foi um período de grande expansão da área cultivada de 12% a 18% ao ano, além da entrada de novos produtores no mercado (NEVES et al., 2010; MONASTERIO; REIS, 2008).

A laranja ganhou maior visibilidade no mercado interno uma vez que, por ter sua produção aumentada e preço diferenciado, se tornou um fruto acessível a todas as classes sociais no Brasil (NEVES et al., 2010). Atualmente, o estado de São Paulo tem papel de destaque no setor citrícola, apresentando superioridade tanto na produção quanto na competitividade internacional. O estado detém 53% da produção total de suco de laranja, sendo que 81% da produção mundial de suco de laranja é produzido na Flórida (EUA) e no estado de São Paulo (NEVES, et al., 2010).

A notabilidade da citricultura não está apenas no desenvolvimento da economia brasileira. Este setor tem amplo impacto na criação de empregos, na formação de capital, na geração de renda, na agregação de valor e, também, no desenvolvimento regional (ZULIAN; DÖRR; ALMEIDA, 2013). De acordo com Neves

e colaboradores (2010), esse setor promoveu um total de 230 mil empregos diretos e indiretos no Brasil e uma massa salarial anual de R\$ 676 milhões.

A massa de empregos gerada pela citricultura é maior do que a gerada por outras culturas no estado de São Paulo. A razão de empregos para trabalhadores temporários por hectare nas plantações de laranja, por exemplo, é de um para cada 9 hectares, ao passo que no caso da cana-de-açúcar a razão é de um emprego para cada 41 hectares. Esses dados revelam como é importante esse setor na geração de empregos e na movimentação da economia do país, principalmente no estado de São Paulo (NEVES et al., 2010).

O Fundecitrus calculou a terceira reestimativa da safra de laranja 2015/2016 do parque citrícola de São Paulo e Minas Gerais, tendo esta produção o valor de 289,92 milhões de caixas, de 40,8 kg cada. Este número representa um aumento de 1,3% em relação à reestimativa de dezembro e de 3,8% da estimativa inicial de maio/2015. O que levou a este avanço foi o forte volume de água das chuvas, acima da média histórica, favorecendo o aumento do tamanho e peso dos frutos e, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de laranjas necessárias para atingir o peso de 40,8 kg por caixa (CITRUS BR, 2016).

A citricultura abrange o cultivo de várias espécies de laranja, limão, lima e tangerinas. O gênero *Citrus* compreende as famílias das Meliáceas, Simaruláceas e Rutáceas (ALVES; MELO, 2003). Dentre as espécies de frutos mais cultiváveis temos as laranjas doces (*Citrus sinensis* Osbek), as tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), os limões verdadeiros (*Citrus limon*, Lush), as limas ácidas tahiti (*Citrus latifolia*, Tanaka) e galego (*Citrus aurantifolia*, Tanaka), o pomelo (*Citrus maxima*) e outras espécies menos conhecidas. As tangerinas possuem a maior faixa de adaptação climática entre os citros, devido a sua grande estabilidade a variações de temperatura e, portanto, existem muitas variedades, sendo que são quatro as de uso comercial: as Satsumas (*Citrus unchiu*, Marchovitch), as Mexericas (*Citrus deliciosa*, Tenore), as do grupo King e as Mandarinas ou Tangerinas comuns (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005).

Apesar de bem adaptado no Brasil, o gênero *Citrus* tem sofrido o ataque de doenças e pragas, sobretudo no estado de São Paulo, onde a cultura é feita de maneira intensiva. Atualmente os citros vêm sofrendo com doenças bacterianas

como por exemplo o “Greening” (“Huanglongbing/HLB”), a Clorose Variegada dos Citros (CVC) e o Cancro Cítrico, tendo esta última o seu primeiro relato em 1957 e desde então tem causado sérios problemas para a citricultura do país. Contudo, foi em 2012 que se registrou a maior incidência da doença no parque citrícola paulista.

Nos últimos anos, houve diminuição do consumo de suco no mercado externo, acarretando em elevados estoques e acúmulo de laranjas não processadas nas indústrias. Além disso, o baixo preço das caixas de frutas levou os produtores a abandonar os pomares, resultando em problemas fitossanitários, com danos irreversíveis e erradicação completa de pomares, que chegaram a comprometer a safra 2013/14 (CONAB, 2013).

2.2 Cancro cítrico, sintomatologia e disseminação da doença

Entre os problemas fitossanitários que acometem a citricultura, o cancro cítrico é uma das doenças de citros mais temidas, pois afeta todas as variedades de importância econômica, sendo algumas mais susceptíveis que outras (DAS, 2003). Existem 3 tipos de cancro cítrico: A, B e C. O tipo A, de origem asiática, é o mais severo, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), afeta grande número de espécies da família Rutaceae, sendo o mais relevante no Brasil. O agente causal das cancores B e C é a *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipos B (XauB) e C (XauC), respectivamente. Os isolados de XauB possuem patogenicidade restrita a limões verdadeiros e limas ácidas, enquanto que isolados de XauC afetam principalmente lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) (KAPP, 2011).

A doença causada por Xac é caracterizada pela formação de lesões circulares, corticosas e eruptivas resultantes dos fenômenos de hipertrofia e hiperplasia das células hospedeiras em resposta à infecção, que se manifestam de uma semana a dois meses (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). A severidade dos sinais varia conforme as espécies de citros. Inicialmente os sintomas de cancro cítrico surgem, em geral, na face inferior das folhas, na forma de pequenos pontos salientes de coloração marrom claro e, à medida que a doença avança, estas lesões tornam-se maiores e mais escuras. Em estágio bem avançado, os danos podem

apresentar halo de coloração escura e rachaduras no centro, resultado da morte do tecido foliar. Lesões tipo encharcamento (“water soaking”), frequentemente aparecem circundadas por um halo clorótico. Os sintomas podem aparecer em folhas, frutos e, mais raramente, em ramos (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; MOREIRA et al., 2004; DOCENA, 2006) (Figura 1).

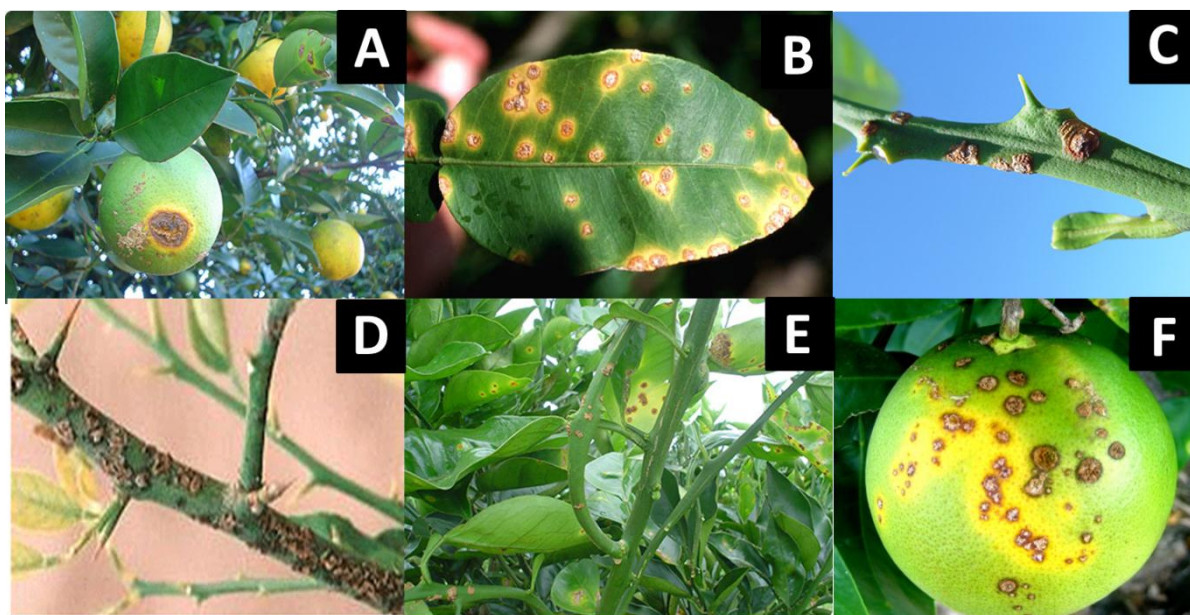


Figura 1. Sintomas característicos do cancro cítrico tipo A em frutos (A e F), folhas (B e E) e ramos (C e D). Podem-se observar lesões de cancro rodeadas por halos cloróticos e erupções em folhas, ramos e frutos. Fontes: FUNDECITRUS, 2016 e “The American Phytopathological Society”. Fonte: <http://www.apsnet.org/publications/Pages/default.aspx>

Em plantas com altas taxas de infecção e/ou hospedeiros mais susceptíveis ocorre desfolha prematura, queda de frutos e declínio geral da planta (MASSARI; BELASQUE-JÚNIOR, 2006). Com a depreciação da qualidade dos frutos, a produção diminui, causando prejuízo econômico pela não comercialização do mesmo (DAS, 2003). E, sendo esta uma doença quarentenária nos principais países produtores de citros, limitações foram estabelecidas pelo comércio mundial para importação de frutas cítricas provenientes de países ou regiões com cancro cítrico (FERREIRA, 2009).

A disseminação do cancro cítrico não depende de vetor, como é o caso do “greening” ou “Huanglongbing” (HLB), cuja transmissão das bactérias

Candidatus Liberibacter asiaticus e *Candidatus Liberibacter americanus* é feita pelo inseto psilídio *Diaphorina citri*. A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* se espalha de forma direta, ou seja, por meio de chuva e vento, do material de colheita, do trânsito de veículos e máquinas agrícolas e, também, pelo próprio colhedor (FUNDECITRUS, 2016). Além disso, pode propagar-se na cultura por sementes contaminadas e por ferimentos causados por insetos (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Quanto à colonização da bactéria no hospedeiro, geralmente inicia-se de maneira epífita, sem causar doença. Em um dado momento, quando as condições ambientais lhes tornam favoráveis, o patógeno entra no hospedeiro por meio dos estômatos (Figura 2) ou hidatódios, aberturas naturais das folhas, ou através de ferimentos mecânicos, causados por equipamentos, atrito entre partes da própria planta, abrasão de partículas de poeira, etc.; e ainda por ferimentos causados por insetos como, por exemplo, a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton), colonizando os espaços intercelulares (LAIA, 2007; FUNDECITRUS, 2016).

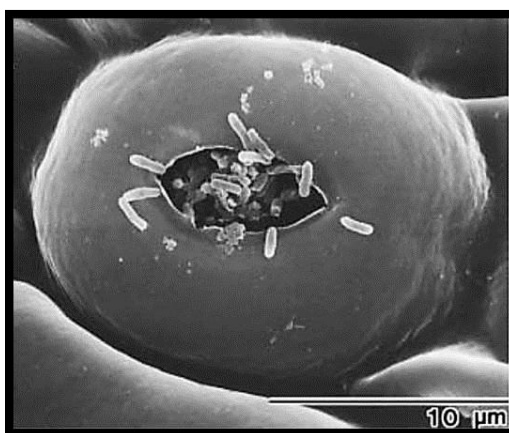


Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* saindo pelo estômato de uma folha de *C. paradisi* que foi inoculada com a bactéria (GRAHAM et al., 2004).

A larva minadora dos citros é uma participante intrínseca na disseminação do cancro cítrico devido à formação de galerias na superfície foliar, o que facilita a penetração da bactéria (CHAGAS et al., 2001). Estas galerias são provenientes do rompimento da cutícula e da epiderme durante a alimentação da larva, expondo o mesófilo foliar e deixando o hospedeiro mais susceptível à infecções do que aquelas

causadas pelo vento e espinhos (BERGAMIN-FILHO; HUGHES, 2000). A água e temperaturas entre 20°C e 30°C são, contudo, fatores essenciais para a penetração do patógeno na planta; dessa forma, a doença é severa em regiões ou áreas caracterizadas pela umidade e calor (DAS, 2003).

Não existe um controle eficiente para o cancro cítrico, sendo que o método mais seguro de erradicar a doença dos pomares é por meio da eliminação das plantas contaminadas, um processo que traz significativas perdas econômicas. No estado de São Paulo, que possui a maior área de produção de citros no país, até o ano de 2009, por lei, todas as plantas deveriam ser eliminadas ao redor do foco da infecção num raio de 30 m (LAIA et al., 2009). Quando as plantas contaminadas excediam 0,5% do total, todo o talhão deveria ser eliminado, sendo proibido o cultivo de citros no local pelos próximos dois anos (LAIA, 2007) sem que o citricultor tivesse direito a qualquer tipo de indenização (SOUZA, 2010).

Todavia, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do estado de São Paulo publicou no Diário Oficial do Estado de 1 de novembro de 2013, a Resolução SAA - 147 que mudou as regras de controle do cancro cítrico no estado. A nova resolução estabeleceu que não era mais necessário fazer a erradicação das plantas situadas em um raio de 30 metros da planta contaminada. A exigência passou a ser eliminar a planta infectada e pulverizar com cobre as que estiverem no raio de 30 metros, devendo a pulverização ser repetida a cada brotação. Além disso, o citricultor passou a ser o encarregado de cumprir uma vistoria trimestral em todas as plantas de citros da propriedade, com as inspeções sendo informadas à Secretaria de Agricultura por meio de relatórios semestrais (FUNDECITRUS, 2013).

A inspeção ainda é considerada a melhor medida para manter os pomares livres da doença. É recomendado adquirir mudas sadias, plantar quebra-ventos de árvores de grande porte nas fronteiras da propriedade para evitar a ação do vento e da poeira sobre o pomar e controlar as larvas minadoras. Do mesmo modo, todo o material usado na erradicação, como enxadas, máquinas e implementos (trator e grade) e os EPIs (equipamentos de proteção individual) deve ser desinfestado com produto erradicante a base de hipoclorito ou amônia quaternária (FUNDECITRUS, 2016).

2.3 Espécies de *Xanthomonas* e suas características

O agente etiológico do cancro cítrico é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (anteriormente classificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, cuja abreviação, Xac, será usada para menção da bactéria ao longo do trabalho), pertencente ao gênero *Xanthomonas* e família Pseudomonadaceae. A Xac é uma bactéria gram-negativa, aeróbica estrita, bastonetiforme e uniflagelar (monotríquia) (Figura 3), apta a induzir sintomas de cancro em todas as espécies de *Citrus* economicamente importantes, além de outros gêneros da família Rutaceae (MASSARI; BELASQUE-JÚNIOR, 2006). O gênero *Xanthomonas* compreende um importante grupo de bactérias fitopatogênicas, possuindo 27 espécies diferentes e em torno de 140 patovares que interagem com mais de 400 espécies de plantas, incluindo diversas de relevância econômica, como por exemplo, arroz, tomate, pimenta, repolho, feijão e banana (PARKINSON et al., 2007; RYAN et al., 2011).

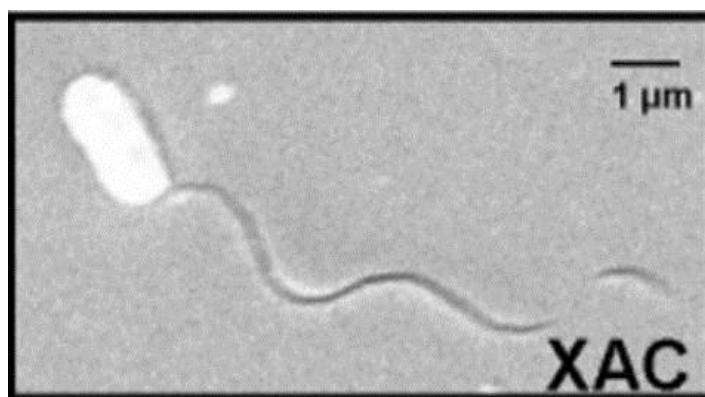


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, onde é possível observar a presença do flagelo único (MOREIRA et al., 2010).

A espécie *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é quimiorganotrófica, isto é, utiliza fontes de carbono de diversos carboidratos para a obtenção de energia. Sua temperatura ótima de crescimento está entre 25°C e 30°C e é facilmente isolada de tecido vegetal infectado. Em meio de cultura artificial, ocorrem predominantemente isoladas e, em geral, formam colônias mucoides lisas e amarelas (LAIA et al., 2009) devido a presença de um pigmento insolúvel ligado a membrana, chamado

xanthomonadina, que forma a goma xantana (BRADBURY, 1984; FARIA, 2005; BUTTNER; BONAS, 2010).

A goma xantana é um polissacarídeo extracelular (EPS), também chamado de biopolímero, produzido por fermentação. Dentre as gomas microbianas, esta se destaca pela sua aplicação em diversas áreas e produtos das indústrias química, alimentícia, petrolífera, farmacêutica, cosmética, de tintas, têxtil e agrícola, participando da produção de espessantes, estabilizantes, gelificantes, agentes de suspensão e de floculação, entre outros (MULCHANDANI; LUONG; LEDUY, 1988; ASHTAPUTRE; SHAH, 1995; FARIA, 2005; DINIZ; DRUZIAN; AUDIBERT, 2012). Ademais, a goma xantana desempenha um importante papel na sobrevivência de *Xanthomonas* e na eliciação dos sintomas durante a infecção ao hospedeiro.

São conhecidas duas formas de colonização de *Xanthomonas* spp. Existem espécies que colonizam o espaço intercelular do hospedeiro de forma pontual, como *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em citros, *X. campestris* subsp. *vesicatoria* em pimenta e tomate e *X. oryzae* subsp. *oryzicola* no arroz, enquanto outras se espalham sistemicamente através dos vasos de xilema, *Xanthomonas oryzae* subsp. *oryzae* no arroz, *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* em crucíferas (BÜTTNER; BONAS, 2010) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* na mandioca (VERDIER et al., 2004). Após a colonização no hospedeiro, a bactéria ativa a expressão de genes envolvidos com motilidade e ancoramento e, seguindo-se um período de crescimento endofítico, utiliza o sistema de secreção de proteínas tipo III (SST3) para transferir efetores de virulência para o interior da célula hospedeira (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Uma vez dentro da célula hospedeira, as proteínas efetoras, ou Avr (avirulência), como são conhecidas, modulam as atividades celulares do hospedeiro, provavelmente alterando a expressão de genes da planta e/ou suprimindo as respostas de defesa.

2.4 Sequenciamento do genoma de Xac e o interesse na ORF XAC0024

Devido à sua importância econômica, pesquisadores brasileiros da rede Onsa (“Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis”), financiados pela FAPESP, sequenciaram o genoma completo do isolado 306 da *Xanthomonas axonopodis* pv.

citri (Xac 306), atualmente nomeada de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico (DA SILVA et al., 2002), o que possibilitou uma série de estudos de genômica funcional e genética reversa com o intuito de se obter uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na interação com os hospedeiros *Citrus* e com a patogenicidade e virulência da bactéria (MARTINS et al., 2010). Entretanto, deve-se igualmente conhecer quais genes são requeridos para o desenvolvimento da bactéria e em quais condições são requeridos.

O sequenciamento mostrou a presença de um cromossomo circular de 5.175.554 pares de bases (pb) e dois plasmídeos, um menor, pXAC33, com 33.699 pb, e outro maior, pXAC64, com 64.920 pb. A anotação do genoma revelou a presença de 4.313 fases de leitura aberta (*Open Reading Frames* – ORFs) codificando proteínas, das quais 62,83% foram associadas com proteínas de função conhecida em outros organismos e 37,17% representavam proteínas hipotéticas, ou seja, sem função conhecida. Outro fato interessante foi que aproximadamente 40% dos genes de Xac possuíam similaridade com genes ortólogos de outros organismos fitopatogênicos sequenciados até aquele momento, sugerindo que estariam envolvidos com a interação planta-patógeno (DA SILVA et al., 2002).

A disponibilidade do genoma da Xac permitiu o uso de abordagens de genômica funcional para o estudo tanto da bactéria como de sua interação com o hospedeiro, ou seja, o estudo da interação planta-patógeno no patossistema Xac-citro. Assim, duas abordagens foram utilizadas de início com foco na bactéria: análise dos genes expressos por Xac em condições infectantes pela técnica de microarranjos de DNA (LAIA, 2007) e mutagênese aleatória *in vivo* por transposon (LAIA et al., 2009). Na estratégia de mutagênese por inserções aleatórias por meio do transposon Tn5 foi construída uma biblioteca com aproximadamente 10.000 mutantes viáveis (LAIA et al. 2009). Destes, 3.300 foram inoculados em folhas de lima ácida 'Galego' para avaliação do fenótipo, sendo encontrados 44 mutantes com virulência alterada, dos quais 8 apresentaram perda completa dos sintomas de cancro. Dos mutantes avaliados, 22% tiveram a inserção do transposon em ORFs que codificam proteínas hipotéticas. Na análise do transcriptoma da Xac por microarranjo, foram descritos os genes cuja expressão foi induzida ou reprimida nos tempos de 24, 72 e 120 horas após a infecção (LAIA, 2007).

Nos experimentos realizados por Laia (2007) e Laia et al. (2009), foram encontradas três ORFs que codificam proteínas hipotéticas com um domínio catalítico peptidase M23 putativo: XAC0024 e XAC3368, que foram mutadas com o transposon TN5, mas cujos fenótipos não foram analisados (LAIA et al., 2007); e XAC3898 que, no macroarranjo, apresentou expressão induzida 24 horas após a inoculação da Xac em folhas de lima ácida 'Galego', mas que se mostrou inibida às 72 e 120 horas (LAIA, 2007). Este fato levantou perguntas como: porque três proteínas hipotéticas conservadas em Xac compartilhando o mesmo domínio catalítico? Estariam elas programadas para trabalhar em conjunto em alguma via metabólica relacionada com a patogenicidade da bactéria? Sabe-se, através da literatura que, as peptidases quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas e exercem diversas funções fisiológicas de grande relevância para o metabolismo das células, tanto que estão presentes em todas as formas de sistemas biológicos, dos vírus aos vertebrados (TURK et al., 2000; POTEPA; PIKE, 2005) e poderiam portanto, estarem envolvidas no processo de patogenicidade de Xac em citros através de, possivelmente, clivagem de proteínas importantes para o metabolismo da planta hospedeira.

Dentre as três ORFs com domínio catalítico peptidase M23 putativo, a ORF XAC0024 foi escolhida como objeto de estudo deste trabalho pelo fato de conter no início de sua codificação um peptídeo sinal composto por 20 aminoácidos, segundo pesquisas realizadas em programas de bioinformática, sendo um deles o *SignalP 4.1 Server* (PETERSEN et al., 2011) (Figura 4). Já foi demonstrado que muitas proteínas de bactérias patogênicas, que carregam um peptídeo sinal em sua estrutura, estão destinadas a serem transportadas para fora da célula pelos sistemas de secreção tipo II ou tipo III, com o objetivo de causar doença em seu hospedeiro; elas são chamadas de proteínas efetoras de patogenicidade (BUTTNER; ULLA BONAS, 2010; YAN; WANG, 2011; RYAN et al., 2011; BRUNINGS; GABRIEL, 2003; ZHOU et al., 2015; ZIMARO et al., 2014; SOARES et al., 2010; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005)

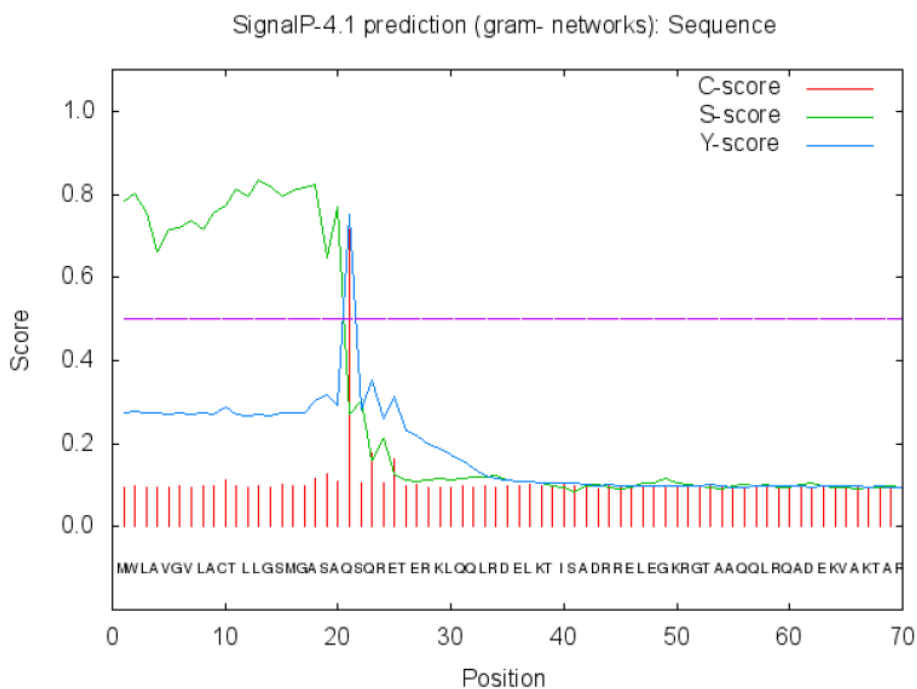


Figura 4. Resultado da busca de presença de peptídeo sinal na ORF XAC0024 no programa *SignalP 4.1 Server* (PETERSEN et al., 2011). O programa prediz um peptídeo sinal formado pelos primeiros 20 aminoácidos, com sítio de clivagem entre os aminoácidos 20 e 21.

Ademais, a ORF XAC0024 contém 1.236 pares de bases (pb) e está localizada na fita complementar do genoma da *Xac*, entre as sequências nucleotídicas de 27.117 pb (“start codon”) a 25.882 pb (“stop codon”). Sua sequência gera uma proteína de 411 aminoácidos (ALTSCHUL et al., 2005), com alguns domínios característicos (Figura 5). O domínio Peptidase M23, já citado, abrange uma superfamília de proteínas responsável pelo processo de proteólise. Além deste domínio, possui também um domínio DUF1003 de uma superfamília de função desconhecida e multidomínios como EnvC, PRK11637, SMC_prok_B e APG6 (NCBI, 2016) (Figura 5).

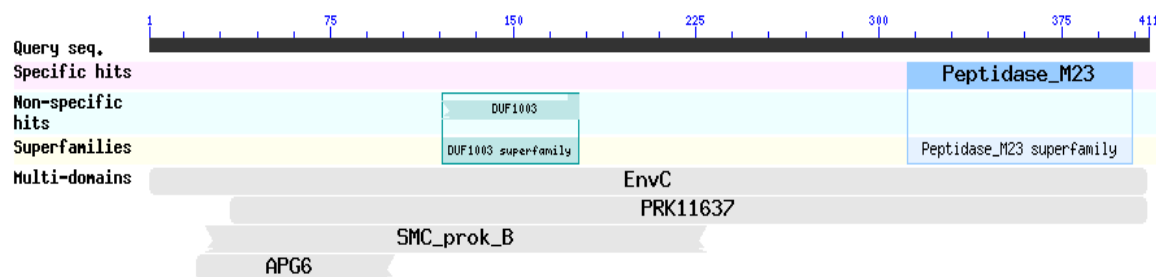


Figura 5. Arquivo de saída da análise da ORF XAC0024 pelo “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Nele estão preditos a localização das superfamílias Peptidase_M23 e DUF1003 e dos multidomínios EnvC, PRK11637, SMC_prok_B e APG6 ao longo da sequência de 411 aminoácidos da ORF.

No estudo de Laia (2007), o mutante da ORF XAC0024 foi nomeado de 17F10 e classificado como um mutante cujo *locus* XAC0024 codifica para uma proteína hipotética localizada no envelope celular. Esta informação levantou dúvidas e curiosidade em saber qual seria a verdadeira função e localização desta proteína, se ela realmente é exportada para fora da célula bacteriana ou se fica aderida no envelope celular participando de processos metabólicos básicos ao desenvolvimento da bactéria. Ademais, a inexistência da descrição do fenótipo do mutante 17F10 indicou que o mesmo, ou não teve o seu fenótipo analisado *in planta* ou reverteu ao fenótipo selvagem.

Portanto, com a intenção de conhecer quais seriam os sintomas que uma mutação na ORF XAC0024 causaria *in planta*, o atual trabalho teve como um dos objetivos, obter um mutante para a ORF XAC0024 através de mutação sítio-dirigida e recombinação homóloga.

2.5 Mutação sítio-dirigida e recombinação homóloga em Xac

Várias abordagens têm sido utilizadas para identificar genes alvos responsáveis por ou participantes dos processos desencadeadores da patogenicidade de Xac em citros. Dentre elas, a mutagênese sítio-dirigida seguida por recombinação homóloga tem sido amplamente utilizada para mutar genes bacterianos com fenótipos ainda não caracterizados e para avaliação de potenciais genes de virulência em várias espécies de microrganismos patogênicos de plantas e animais, como por exemplo *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (HUGUET et al., 1998), *Erwinia chrysanthemi* (RIED; COLLMER, 1987), *Phanerochaete*

chryso sporium (JING; FENG, 2015), *Yersinia enterocolitica* (KANIGA; DELOR; CORNELIS, 1991) e *Vibrio cholerae* (MILLER; MEKALANOS, 1988).

A mutação sítio-dirigida por “PCR de extensão por sobreposição” (*site-directed mutagenesis by PCR overlap extension*) foi estabelecida como um método padrão para a obtenção de mutantes, seja por inserção ou deleção de sequências de DNA. Esta técnica se caracteriza por permitir substituições, inserções ou deleções de pares de bases, com a introdução ou não de sítios de restrição, e envolve a geração de produtos de PCR que se sobrepõem uns aos outros, como o seu nome diz (HIGUCHI; KRUMMEL; SAIKI, 1988; MIKAELIAN; SERGEAN, 1996). O processo aplicado no presente trabalho foi a mutação sítio-dirigida por deleção, que consiste na deleção de um fragmento de DNA em duas etapas de PCR: uma PCR primária (na qual são realizadas duas PCR's independentes) e uma PCR de ligação.

Primeiramente são sintetizados quatro oligonucleotídeos: dois quiméricos (B e C) localizados internamente ao fragmento que se pretende deletar, e dois não quiméricos (A e D) localizados periféricamente ao mesmo fragmento. Os oligonucleotídeos quiméricos, são concebidos para conter de 18 a 21 nucleotídeos (nt) derivados das sequências do molde e 9 nt a partir do fragmento a ser recombinado. Estes 9 nt são chamados de cauda complementar. Já os oligonucleotídeos não quiméricos, devem incluir locais de restrição nas extremidades para facilitar a clonagem subsequente do produto de PCR ligado (LEE et al., 2004).

Posteriormente, são realizadas duas “PCR's” independentes que empregam os pares de oligonucleotídeos A-B e C-D. Em seguida, os dois fragmentos originados são utilizados como molde na segunda PCR, a de ligação, na qual os oligonucleotídeos A-D são empregados. Nesta PCR de ligação, denominada também de extensão por sobreposição, os fragmentos A-B e C-D se unem por meio das caudas complementares deletando, assim, a região do gene localizada entre os oligonucleotídeos B e C e formando o fragmento A-D (LEE et al., 2004) (Figura 6). Em outras palavras, a eliminação é essencialmente uma ligação ou recombinação de dois fragmentos de DNA separados.

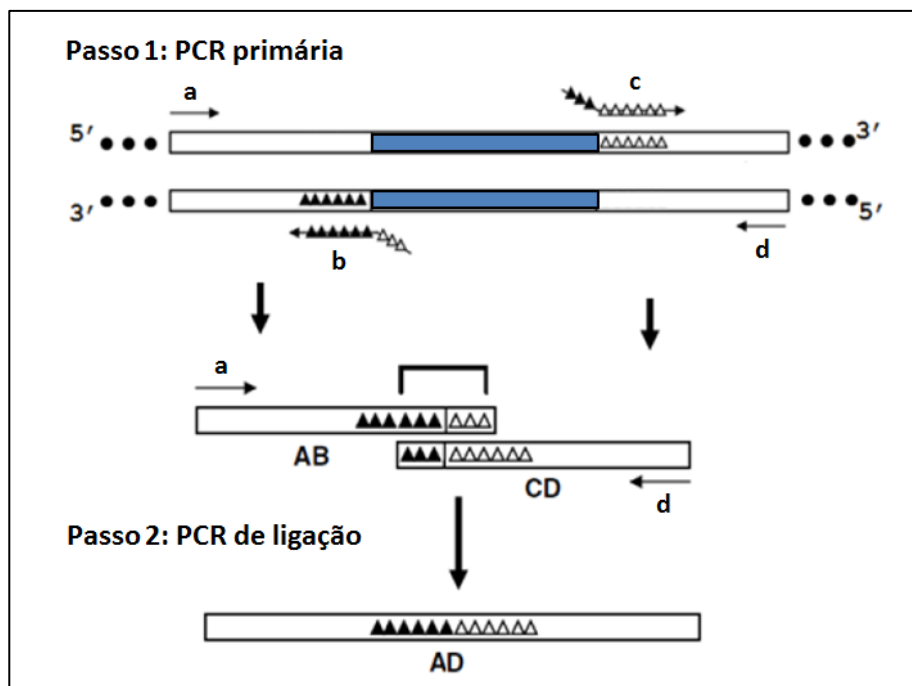


Figura 6. Modelo esquemático da mutação sítio-dirigida por deleção, adaptado de Lee e colaboradores (2004). No primeiro passo, denominado de PCR primária, são utilizados dois pares de oligonucleotídeos (“a” com “b”) e (“c” com “d”) para gerar os fragmentos A-B e C-D. No segundo passo, denominado de PCR de ligação, utiliza-se os pares de oligonucleotídeos (“a” com “d”) e obtém-se o produto AD, que é uma versão curta do gene (fragmento mutado). A região sombreada em azul pertence ao segmento deletado.

A Genética reversa, baseada na alteração de um genótipo para posterior análise do fenótipo, é empregada neste estudo através da permutação de alelos por recombinação homóloga. A recombinação homóloga é promovida pelo uso de vetores plasmidiais que carregam o novo gene a ser introduzido no cromossomo bacteriano e que são incapazes de se replicar no hospedeiro onde as mutações são introduzidas (KANIGA; DELOR; CORNELIS, 1991).

O plasmídeo pOK1, construído por Huguet e colaboradores (1998) a partir do plasmídeo pKNG101 (KANIGA; DELOR; CORNELIS, 1991), é um vetor suicida mobilizável, que facilita a recombinação homóloga através da combinação da origem de replicação condicional (*oriR6K*), com a origem de mobilização (*mobRK2*), o marcador de seleção positiva *sacB* (gene mediador de sensibilidade à sacarose), o marcador de resistência a antibióticos (Sp^R) e vários sítios de clonagem. Esta construção só se replica em hospedeiros bacterianos que fornecem em *trans* a proteína π codificada pelo gene *pir* (KOLTER et al., 1978), tais como linhagens de *E.*

coli lisogenizada com um fago lambda transduzindo *pir*. Ele permite a construção fácil de mutações não marcadas (inserção ou exclusão) em quaisquer espécies de bactérias Gram negativas, onde a expressão do gene *sacB* em presença de sacarose é letal (KANIGA; DELOR; CORNELIS, 1991) (Figura 7).

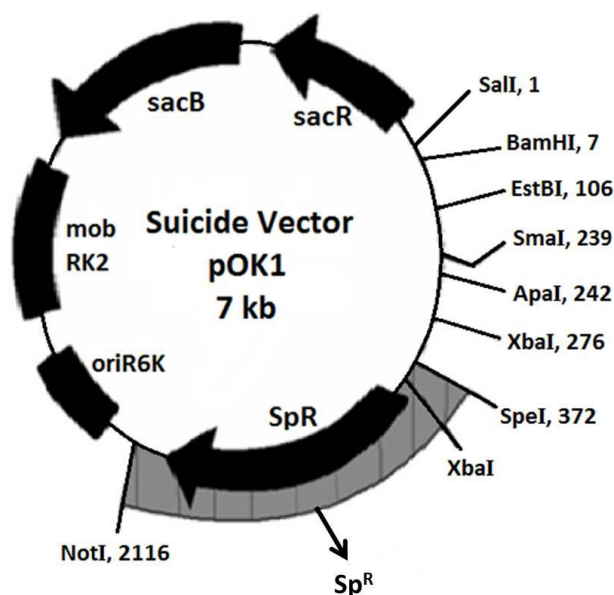


Figura 7. Mapa do vetor suicida pOK1.

A integração no genoma do hospedeiro de um gene mutado clonado em um vetor suicida é prontamente obtida por seleção com ajuda do marcador de resistência a antibiótico carregado pelo vetor. Uma única recombinação homóloga entre o gene selvagem e o alelo mutado presente no plasmídeo resulta em um diploide para o gene de interesse, e o advento de um segundo *crossing-over* é necessário para eliminar o alelo selvagem, bem como o vetor suicida. Este segundo evento só pode ser detectado por triagem pela perda do marcador de seleção do antibiótico (KANIGA; DELOR; CORNELIS, 1991). Seleções positivas de recombinantes duplos utilizando o gene *sacB* de *Bacillus subtilis* já foram relatados em *Erwinia chrysanthemi* (RIED; COLLMER, 1987), *Escherichia coli* (BLOMFIELD et al., 1991), e *Anabaena* sp. (CAI; WOLK, 1990).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi obter um mutante de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) linhagem 306 que tivesse inativação da ORF XAC0024, com a finalidade de verificar se a mesma desempenha algum papel na patogenicidade da bactéria.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção do mutante da ORF XAC0024 por deleção de parte da sequência;
- Análise *in planta* do fenótipo do mutante em comparação com a Xac selvagem;
- Análise da capacidade de multiplicação *in vitro* e *in planta*, de agregação das células, de formação de biofilme e de produção de goma xantana do mutante em comparação com a Xac selvagem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do DNA da ORF XAC0024

O cosmídeo 0IC02, oriundo da biblioteca de *Xanthomonas* (DA SILVA et al., 2002) e contendo a ORF XAC0024, foi obtido no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da FCAV/UNESP, local onde se encontrava armazenado a -80°C .

Para tal, uma alíquota do mesmo foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura sólido LB (Luria-Bertani: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio e 15 g de ágar, H_2O q.s.p. 1 L, pH 7,0) e o antibiótico de seleção canamicina ($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$), com a placa sendo mantida a 37°C por 16 horas em estufa bacteriológica. Depois do cultivo, uma colônia isolada foi coletada e transferida para um tubo tipo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio de cultura líquido LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio, H_2O q.s.p. 1 L, pH 7,0) contendo canamicina ($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$), o qual foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm. Em seguida, o DNA cosmidial foi extraído e purificado utilizando o Kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (“Thermo Scientific”) a partir do valor da absorbância a 260 nm, considerando que valor de $A_{260\text{nm}}$ igual a 1,0 corresponde a uma solução de DNA com concentração igual a $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ (SAMBROOK; FRITSCHI; MANIATIS, 1989).

4.2 Mutação sítio-dirigida da ORF XAC0024

4.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos

Para a obtenção do mutante da ORF XAC0024 utilizou-se o procedimento de mutação sítio-dirigida por PCR (“Polymerase Chain Reaction”) de extensão por sobreposição, o qual consiste na deleção de um fragmento de DNA em duas etapas:

uma PCR primária e uma PCR secundária ou de ligação (LEE et al., 2004). Para isso foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos (A-B e C-D) (Tabela 1) a partir da sequência de nucleotídeos da ORF XAC0024 presente na base de dados *Genbank* do *The National Center for Biotechnology Information* - NCBI (Figura 8), considerando o comprimento da sequência a ser deletada. Aos oligonucleotídeos B e C foram adicionadas caudas de bases nitrogenadas complementares às sequências dos próprios oligonucleotídeos – uma cauda em cada oligonucleotídeo. No presente trabalho, a cauda do oligonucleotídeo B foi sintetizada contendo as nove primeiras bases nitrogenadas reversas complementares do oligonucleotídeo C. Já a cauda do oligonucleotídeo C foi composta pelas nove últimas bases nitrogenadas senso do oligonucleotídeo B. Logo, as sequências A-B e C-D se unem por meio das nove bases nitrogenadas complementares na PCR de ligação (LEE et al., 2004) (Figura 6). A ORF XAC0024 está presente na fita complementar do genoma da Xac.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante da ORF XAC0024, os quais foram desenhados manualmente a partir de sua própria sequência.

| Nome do produto | Nome do oligonucleotídeo | Sequência 5'→3' | Amplicon (pb) |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------|
| Fragmento A-B | A(F)* | CAGAGCCAGCGGAGACCGAG | 318 pb |
| | B(R)** | ACGGTGGTGCAGCGGTGCATTGCGGCCAC | |
| Fragmento C-D | C(F)** | GCACCGCTGCACCACCGTGACTGCAGTGGC | 283 pb |
| | D(R)* | TCAGCGGCGTTGCAGCCAGCT | |
| Fragmento A-D | A(F)* | CAGAGCCAGCGGAGACCGAG | 583 pb |
| | D(R)* | TCAGCGGCGTTGCAGCCAGCT | |
| Fragmento no vetor pGEM-T Easy | T7 Promoter (F)*** | TAATACGACTCACTATAGGG | - |
| | Sp6 Promoter (R)*** | TTCTATAGTGCACCTAAAT | |

(F): Sequência do oligonucleotídeo direto (*Forward*); (R): Sequência do oligonucleotídeo reverso (*Reverse*).

As sequências em vermelho dos oligonucleotídeos B e C correspondem às caudas complementares das sequências em azul (regiões complementares) dos oligonucleotídeos B e C em que se ligarão.

*Oligonucleotídeos sintetizados pela Exxtend Biotecnologia Ltda.

**Oligonucleotídeos sintetizados pela Invitrogen (Life Technologies).

***Oligonucleotídeos obtidos junto ao CREBIO: Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica – FCAV/UNESP.

```

>gi|21240774:c27117-25882 Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306
chromosome, complete genome
ATGTGGCTGGCGGTGGGCGTGGCCTGCACCTTGTGGGCAGCATGGGCGCAAGCGCGCAGAGCCAGC
GCGAGACCCGAGCGCAAATTGCAGCAGCTGCGCGATGAGCTCAAGACCATCAGCGCCGATCGACGCGAACT
GGAAGGCAAGCGCGGCACCGCCGCGCAACAGTTGCGCCAGGCCGACGAGAAAGTGGCCAAGACCGCACGT
GCATTGAGCGAGACCGAAGCGGCGATGCGCGCGCAGGAACAGCATCTGTCCACCCTGCAGCAGGAACGCG
CGCAATTGCAGCGCGGCCTGCAGAACCAGCGCGCGCAGCTGGCGGCGTTATTGCGCGCCGCCGATCAGGT
GGGCGCAATGCACCGCTGAAGGTGCTGCTGTGCGCAGGACACGGTGGGCGATGCCACGCGTATGCTGGCC
GATCACCGCTATGTGCAAAAACGCACGCGCGCAGCGCATCCACGCCTTGACCACGCAACTGGATGCCCTGG
CGACAGTGGAAACAGGACATCGCCACCCGGCGCCAGGCGCTGGATGCCGCGCGTGCAGCAGAAAAAGCGCA
GGCGGCCACGTTGCAGAAGGATCGCTCGCAACAGGCGGCCACCGTGCAGCAGCTGGACGATCGCTACAAA
CAGCGCGCCGAGCGCGAAAAGGCAATCGGCCAGGACGCCAAGGCGCTGGAACAACCTGCTCGCCAATCTGC
GCGCGGCCCGCCCAAGGCCGAAGCCGAACGGCGCGCTGCCGCCAGACGCGCCGCCCGCCGAAGCCGCCGC
ACAGGCCAAGCGCAGCAAAAACCGAGCGTTCCGATCGCCCCGGCAAGACGCCATCCAAGGTAGTCGCCAAC
GCACCGGCCCCCAAGGTGGTGGGCTCAGCTGGCCGGTGGCGGGCAATCTGCTGGCGCGCTTCAATGCCA
CCTTGCCCCGATGGCCACACCAGCAAGGGCGTGTGATCGGCGCGCCCAAGGGCACCACCGTGACTGCAGT
GGCCGATGGCACGGTGGTGTTCCTCGACTGGATGACCGGCTACGGCATGATCCTGATCGTGGACCACGGC
AACGGCTACATGAGCCTGTACGCGCATAACGACACCTTGTGCGCGATGCCGGCGCAACGATCAAACGTG
GCGACGCGGTGGCCAAGGTGCGCAGTTCGGGCGGGCAGGGCGTGCCGGCGCTGTACTTCGAATTGCGTCG
CAACGGGCAGCCGGTGGATCCATCGAGCTGGCTGCAACGCCGCTGA

```

Figura 8. Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC0024 presente no banco de dados *Genbank* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas em cinza, amarelo, azul e vermelho, respectivamente. As setas pretas indicam a direção de amplificação dos oligonucleotídeos, as letras destacadas em vermelho no início da ORF (extremidade 5') indicam as bases que codificam o peptídeo sinal e as letras sublinhadas correspondem à região em que as caudas complementares se ligarão por complementariedade.

4.2.2 Obtenção dos fragmentos A-B, C-D e A-D por PCR

As PCRs primárias para a obtenção dos fragmentos AB e CD procederam-se da seguinte forma: foram montadas, separadamente, em um volume final de 20µL, consistindo-se, cada reação, de 26,5 ng de DNA cosmidial, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de *Phusion® High Fidelity DNA Polymerase* (“Thermo Scientific”), 1X do tampão da enzima, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 3% de DMSO (Dimetilsulfóxido) para A-B, 5% de DMSO para C-D e o volume completado com água ultrapura estéril. Para os ciclos de amplificação dos segmentos A-B e C-D, foi utilizado o termociclador “Veriti® 96-Well Thermal Cycler” (“AB Applied Biosystems”) com o programa de desnaturação inicial a 98°C por 30 seg, 35 ciclos de 98°C por 10 seg, 69°C por 30 seg e 72°C por 30 seg, seguidos por uma extensão final a 72°C por

10 min. A amplificação dos genes foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, contendo 10 mg/mL de brometo de etídeo, com o tampão de corrida TBE (Tris-Borate-EDTA: 54 g Tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0 para 1 L) a 0,5X a 3 V/cm. Os fragmentos amplificados foram visualizados em luz ultravioleta e documentados por fotografia no equipamento BIORAD.

Os segmentos A-B e C-D obtidos na amplificação foram purificados dos produtos de PCR utilizando-se o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), segundo as instruções do fabricante, e quantificados no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (“Thermo Scientific”) a partir do valor da absorbância a 260 nm. Após a quantificação, foram utilizados como molde na PCR de ligação, adotando-se o mesmo protocolo utilizado na PCR primária, porém, utilizando-se como iniciadores os oligonucleotídeos A e D, 3% de DMSO, em volume final de 50 µL, temperatura de 72°C no anelamento, e 25 ciclos de amplificação. A amplificação do segmento A-D foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (0,7%) e a banda correspondente ao tamanho do *amplicon* esperado foi cortada e purificada do gel de agarose com o Kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). O DNA purificado foi quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (“Thermo Scientific”) a partir do valor da absorbância a 260 nm. Em seguida, foi adicionado 1 U de *Platinum® Taq DNA Polymerase recombinant* (Invitrogen) e o microtubo mantido a 72°C por 10 min no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) para a adição da base A nas extremidades 3’ do fragmento, necessária para clonagem no vetor pGEM®-T Easy (Promega), que é um vetor TA, ou seja, um vetor aberto, pronto para clonagem, que possui uma base T nas extremidades 5’. O produto gerado foi utilizado imediatamente na etapa subsequente, a clonagem.

4.2.3 Clonagem em vetor pGEM®-T Easy e transformação em *E. coli* DH10B quimicamente competente

O segmento A-D, com suas extremidades 3’ adeniladas, foi primeiramente subclonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega), com o objetivo de adicionar os sítios de restrição das enzimas *Apal* e *SaI*, indispensáveis para a clonagem posterior no

vetor suicida pOK1. Para isso foi realizada uma reação padrão, um controle positivo e um controle negativo. Na reação padrão utilizou-se 5 µL do tampão de ligação 2X concentrado (*2X Rapid Ligation Buffer T4 DNA Ligase*), 50 ng do vetor pGEM[®]-T Easy, 117,6 ng do produto de PCR (segmento A-D adenilado nas extremidades 3'), 1 µL da enzima T4 DNA Ligase (*3 Weiss units/µl*) (Promega) e o volume foi completado para 10 µL com água ultrapura estéril. O mesmo procedimento foi utilizado nos controles, alterando apenas a troca do produto de PCR para um inserto de DNA controle (com a mesma quantidade da reação padrão) que é oferecido pelo Kit da Promega no controle positivo e a ausência destes dois componentes (ligase e inserto) no controle negativo. A reação foi mantida em termociclador a 4°C por 16 horas.

Em seguida, os produtos da ligação no vetor pGEM[®]-T Easy foram utilizados para transformar células *E. coli* DH10B quimicamente competentes (Invitrogen). Para tal, 2 µL da reação de ligação foram adicionados a 50 µL das células competentes contidas em um microtubo de 1,5 mL, o qual foi agitado suavemente e mantido em gelo por 20 min. Imediatamente, o tubo foi mergulhado em banho-maria a 42°C por 2 min, retornado ao gelo por 2 min e foi então acrescentado 1 mL de meio de cultura SOC [40 µL de glicose a 20% e 40 µL de cloreto de magnésio 1 M em meio SOB (20 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 0,58 g de cloreto de sódio, 0,2 g de cloreto de potássio, pH 7,5 para 1 L)]. Em seguida o tubo foi incubado a 37°C por 1 hora e 30 min, sob agitação de 150 rpm para recuperação das células através da ativação do fator sigma RpoH que controla a expressão das proteínas do choque térmico, como por exemplo, a DnaK. Posteriormente, volumes de 100 µL e 200 µL foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, 0,1 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) e 0,0032% de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside). Finalmente, as placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 16 horas. Após o cultivo, as colônias brancas obtidas na transformação com o inserto A-D tiveram seus plasmídeos extraídos utilizando-se o kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), segundo instruções do fabricante, e foram utilizados como molde na PCR com os oligonucleotídeos A e D. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 1% para confirmação do tamanho do fragmento amplificado. Para comprovar a

clonagem do inserto de interesse (segmento A-D) e revelar a presença dos sítios das enzimas de restrição *Apal* e *Sall* do vetor pGEM[®]-T Easy, os DNAs plasmidiais contendo o inserto do tamanho esperado foram sequenciados.

4.2.4 Sequenciamento do fragmento A-D clonado no vetor pGEM[®]-T Easy

Nas reações de sequenciamento foram utilizados 100 ng de DNA plasmidial, 3,0 µL de tampão de sequenciamento (*Save money 2,5X*), 1,0 µL de *BigDye v3.1* (“Applied Biosystems”), 10 picomoles dos oligonucleotídeos do vetor pGEM[®]-T Easy [T7 Promoter (*foward*) e Sp6 Promoter (*reverse*)] (Tabela 1) e água bi-destilada estéril para completar o volume final de 10 µL. Ao término da reação de sequenciamento, que consistiu de uma desnaturação inicial de 96°C por 1 min e de 39 ciclos compostos por uma etapa a 96°C por 15 seg, uma etapa a 55°C por 15 seg e uma etapa de polimerização a 60°C por 4 min, as amostras foram mantidas a 4°C. Em seguida, 80 µL de isopropanol a 75% foram adicionados a cada reação. Após 15 min a temperatura ambiente, as reações foram centrifugadas a 3040 g, em centrífuga de placas *Rotanta 46R* (*Hettich*) com rotor para microplacas, por 30 min a 20°C. Após a precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas, duas vezes, com 200 µL de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 3040 g por 10 min a 20°C, na mesma centrífuga *Rotanta 46R*. As amostras foram secas a vácuo, ressuspendidas 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 recomendações sugeridas pelo fabricante. As sequências obtidas foram analisadas usando as ferramentas *blastn* (ncbi), *Bio Edit Sequence Alignment Editor* e *Codon Code Aligner*. Um clone contendo a sequência completa do fragmento A-D no vetor pGEM[®]-T Easy, sem nenhuma troca, inserção ou deleção de base, foi escolhido para a construção do vetor suicida necessário para a obtenção do mutante da ORF XAC0024.

4.2.5 Digestão do vetor pGEM[®]-T Easy com o inserto A-D

Cinco microgramas de DNA plasmidial foi digerido primeiramente com 100 U da enzima *Apal* (“New England Biolabs”), 1X do tampão de digestão *CutSmart*[™] (“New England Biolabs”) e água ultrapura estéril para um volume final de 100 µL. A amostra foi mantida a 25°C por 4 horas e, em seguida, foram adicionadas mais 100 U da mesma enzima e manteve-se a digestão por mais 4 horas a 25°C. Posteriormente, este mesmo DNA plasmidial foi digerido com 80 U da enzima *Sall*-HF (“New England Biolabs”), que usa o mesmo tampão de digestão que a enzima *Apal*, e foi mantido a 37°C por 14 horas, seguido por inativação das enzimas por desnaturação em banho maria a 65°C, por 20 min.

Os produtos digeridos do vetor pGEM[®]-T Easy foram separados em gel de agarose “low-melting” a 0,8% contendo brometo de etídeo a 10 mg/mL e a eletroforese foi realizada com tampão TBE a 0,5X. A amostra foi dividida para ser aplicada em quatro poços no gel, sendo a corrida realizada a 3 V/cm. A banda correspondente ao fragmento de interesse foi recuperada do gel e tratada com fenol-clorofórmio para limpeza do DNA, como descrito a seguir. Inicialmente a banda dos quatro poços foram recortadas, alocadas em quatro microtubos de centrifuga de 1,5 mL e levadas ao banho-maria a 65°C por 15 min para completa dissolução do gel. A seguir, o volume no microtubo foi ajustado para 500 µL com TE 10:0,1 (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) e adicionou-se 0,5 volume de fenol pH 8,0, seguido de agitação por 30 seg em um agitador de tubos (Vortex) e centrifugação por 5 min, a 14.000 rpm e 25°C, na centrífuga “Eppendorf” (5417R). A fase aquosa superior foi recuperada e transferida para outros quatro microtubos novos de 1,5 mL, nos quais foi adicionado 0,25 volume de uma mistura de fenol e clorofórmio (1:1). Novamente, os tubos foram agitados por 30 seg no Vortex e centrifugados por mais 5 min nas mesmas condições acima. A fase aquosa superior foi recuperada e transferida para outros quatro tubos novos de 1,5 mL, sendo agora adicionado 0,5 volume de clorofórmio em cada tubo. Os tubos foram novamente agitados por 30 seg no Vortex e centrifugados como descrito acima. A fase aquosa superior foi transferida para outros quatro tubos novos de 1,5 mL e à solução foi acrescentado 0,10 volume de acetato de sódio 3,0 M, pH 5,2, e 2,5 volumes de etanol absoluto. Por fim, as

amostras foram levadas ao freezer a -20°C e mantidas nesta temperatura por 14 horas (durante a noite). Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 30 min na centrífuga “Eppendorf” (5417R) a 14.000 rpm, a 4°C . Os precipitados foram ressuspensos em 1,0 mL de etanol 70% e centrifugados por 15 min a 14.000 rpm, a 25°C . O sobrenadante foi descartado e o DNA dos 4 tubos foram secos em bomba a vácuo por 5 min (secar demais dificulta a posterior solubilização do DNA). Em seguida, o DNA de cada tubo foi ressuspensado em 5 μL de TE 10:0,1 e o volume de cada tubo foi transferido para um único tubo, totalizando 20 μL . A concentração de DNA presente foi determinada no espectrofotômetro *NanoDrop*[®] ND-1000 (“Thermo Scientific”) a partir do valor de absorvância a 260nm. Para reconfirmar que o fragmento isolado e purificado do gel tinha o mesmo tamanho do fragmento original, 3 μL da solução foi aplicada em gel de agarose a 1% contendo 10 mg/mL de brometo de etídeo e a eletroforese foi realizada com o tampão de corrida TBE a 0,5X. Após a confirmação do tamanho fragmento, ele foi clonado em vetor suicida pOK1.

4.2.6 Clonagem em vetor suicida pOK1 e transformação em *E. coli* SM10 λ pir quimicamente competente

O vetor pOK1 foi digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para digerir o vetor pGEM[®]-T Easy (que continha o inserto mutado). A reação de digestão consistiu primeiramente de 10 μg de DNA plasmidial do vetor pOK1 (vetor fechado), 100 U da enzima *Apal* (“New England Biolabs”), 1 X do tampão de digestão CutSmart[™] (“New England Biolabs”) para um volume final de 100 μL completado com água ultrapura estéril. A solução foi mantida a 25°C por 7 horas e, em seguida, foram adicionadas mais 100 U da mesma enzima e manteve-se a amostra por mais 15 horas a 25°C . Para confirmar a digestão do vetor com a enzima e sua completa linearização, 3 μL desta reação foram aplicados em gel de agarose a 1% contendo 10 mg/mL de brometo de etídeo e a eletroforese foi realizada com o tampão de corrida TBE a 0,5X. Tendo confirmada a digestão e linearização do vetor com a enzima *Apal*, adicionou-se ao restante da solução 80 U da enzima *SaI*-HF (“New England Biolabs”), que possui o mesmo tampão de digestão da enzima *Apal*,

com a solução sendo mantida a 37°C por 16 horas para a digestão com *SaI*-HF. Após este período, as enzimas foram inativadas por desnaturação em banho maria a 65°C, por 20 min. O produto digerido foi submetido à eletroforese em gel de agarose “low-melting” a 0,8% contendo brometo de etídeo a 10 mg/mL em tampão TBE a 0,5X e a banda correspondente ao vetor pOK1 linearizado foi recuperada do gel e tratada com fenol-clorofórmio para limpeza do DNA conforme o procedimento acima (item 4.2.5).

O fragmento de interesse A-D digerido e purificado (ORF XAC0024 contendo a deleção e os sítios de restrição) foi então clonado no vetor pOK1 também digerido e purificado. A reação de ligação foi montada com os seguintes reagentes e quantidades: 150 ng do fragmento A-D, 50 ng do vetor pOK1 (relação molar 1:3 de vetor/inserto, calculado através do software disponível em http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html), 5 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen), 1X do tampão de ligação e o volume foi completado para 10 µL com água ultrapura estéril. A reação de ligação processou-se a 15°C por 16 horas, após o que foi utilizada para transformar células de *E. coli* SM10 λpir quimicamente competentes (fornecidas pelo professor prof. Dr. Henrique Ferreira do Instituto de Biociências, UNESP - Rio Claro). Este passo foi adicionado para que se pudesse confirmar a ligação do inserto mutado no vetor pOK1. A transformação foi efetuada da mesma maneira que na transformação de *E. coli* DH10B quimicamente competente (item 4.2.3), exceto que 50 µL de células competentes foram transformadas com 3 µL da ligação (15 ng de DNA plasmidial) e um volume de 200 µL foi espalhado em placas de petri contendo apenas meio de cultura LB com espectinomicina a 100 µg/mL. As colônias obtidas foram escolhidas aleatoriamente para a extração do DNA do plasmídeo pOK1 com o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) e, em seguida, este DNA plasmidial foi utilizado como molde na PCR com os oligonucleotídeos A e D e o produto de PCR foi aplicado no gel de agarose a 1% para confirmação do tamanho do segmento A-D clonado. A identidade do fragmento clonado no vetor pOK1 foi confirmada por sequenciamento, utilizando as mesmas condições e mesmo sequenciador descritos no item 4.2.4, com exceção dos oligonucleotídeos, os quais foram utilizados agora o A e o D. A partir das sequências obtidas, a

construção (inserto A-D em pOK1) foi confirmada usando as ferramentas *blastn* (ncbi), *Bio Edit Sequence Alignment Editor* e *Codon Code Aligner*.

4.2.7 Transformação em células eletrocompetentes de Xac

O vetor pOK1 com o fragmento A-D clonado foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de Xac 306. A preparação destas células foi realizada da seguinte maneira: uma amostra de células de Xac 306, armazenadas à -80°C em meio LB acrescido de glicerol a 15%, foi plaqueada em placa de Petri contendo meio de cultura sólido NA (Nutrient Agar: 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona e 15 g de ágar bacteriológico para 1 L, pH: 6,8 - 7,0) e mantida à 29°C por 72 horas. Após este tempo, uma alíquota das células recuperadas foi inoculada em 2 mL de meio de cultura líquido NB (Nutrient Broth: 3 g de extrato de carne e 5 g de peptona para 1 L, pH: 6,8 - 7,0) em um tubo tipo Falcon de 15 mL (pré-inóculo) e deixadas a se multiplicarem a 29°C, por 16 horas, sob agitação constante de 200 rpm (“Shaker”). Após o crescimento, os 2 mL de cultura saturada foram transferidos para 200 mL de meio de cultura líquido NB (contido em um *Erlenmeyer* de 500 mL) e deixados novamente sob agitação contínua de 200 rpm, a 29°C, até atingir a densidade óptica de 0,5 a 600nm. A suspensão de bactéria foi dividida em 4 tubos tipo Falcons estéreis de 50 mL (previamente gelados) e, em seguida, foi centrifugada a 12.857 x g a 4°C por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado com cuidado e o “pellet” bacteriano de cada tubo foi ressuscitado suavemente, com a ajuda de uma pipeta regulável de 1000 µL, em 10 mL de água ultrapura autoclavada e gelada. Depois, o conteúdo dos 4 tubos foi transferido para 2 tubos e estes foram completados para 40 mL com água ultrapura autoclavada gelada, homogeneizados por inversão e centrifugados a 12.857 x g a 4°C por 15 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e este processo de lavagem foi repetido mais uma vez. Ao “pellet” da segunda lavagem, foram acrescentados 40 mL de glicerol 10% autoclavado e gelado, sendo o mesmo ressuscitado com a ajuda de uma pipeta regulável de 1000 µL. A seguir a mistura foi centrifugada novamente a 12.857 x g a 4°C por 15 min e o sobrenadante formado foi descartado. Finalmente, o “pellet” foi ressuscitado em 2 mL de glicerol 10% autoclavado e gelado e alíquotas de 50 µL

da suspensão de células de Xac foram adicionadas em tubos de 1,5 mL previamente gelados e, após 1 hora no gelo, foram utilizadas na transformação.

O processo de eletroporação foi realizado com uma reação padrão e com um controle negativo. Na reação padrão, 50 µL de células Xac 306 eletrocompetentes, recém preparadas, foram eletroporadas no equipamento “Gene Pulser Xcell™ System” (Bio-Rad) com 2 µL (500 ng) do DNA plasmidial. No controle negativo, 50 µL de células Xac 306 foram eletroporadas no mesmo equipamento com 3 µL de água ultrapura estéril. As condições foram: cubeta de 1 mm, 1.250 V e TC (ms) igual a 2,6 ms. A recuperação das células eletroporadas foi realizado adicionando-se 1 mL de meio de cultura líquido NBY (8 g de caldo nutriente, 2 g de extrato de levedura, 2 g de K₂HPO₄, 0,5 g de KH₂PO₄ e 2,5 g de glicose para volume final de 1 L com água destilada) suplementado com 20 µL de glicose 10% e 1 µL de MgSO₄ 1M. A solução foi transferida para um tubo tipo Falcon de 15 mL e mantida sob agitação constante de 150 rpm, a 29°C, por 1 hora. Posteriormente, alíquotas de 200 µL da mesma foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NA e antibiótico espectinomicina a 100 µg/mL, com as placas sendo mantidas a 29°C, por 72 horas, até a visualização de colônias isoladas.

4.2.8 Seleção e confirmação dos mutantes

As colônias obtidas após a eletroporação foram empregadas na etapa de seleção dos mutantes conforme procedimento proposto por Kaniga e colaboradores (1991), com modificações quanto ao meio de cultura e antibiótico utilizados. Para isso, amostra de cada colônia foi plaqueada pelo método de esgotamento em meio de cultura sólido NA suplementado com sacarose a 5% e em placas contendo apenas meio de cultura sólido NA. As placas foram mantidas a 29°C por 72 horas até a visualização de colônias isoladas. Foram selecionadas apenas as colônias que cresceram em meio de cultura NA e não cresceram na presença de sacarose. Depois, estas foram semeadas em meio de cultura sólido NA contendo espectinomicina a 100 µg/mL e em meio de cultura sólido NA com sacarose a 5%. Estas placas foram mantidas a 29°C por 72 horas até a visualização de colônias

isoladas. Foram selecionadas apenas as colônias que cresceram na presença da sacarose e não cresceram no meio que continha o antibiótico.

As colônias da última seleção foram empregadas na extração de DNA genômico para confirmação do gene deletado através de PCR, eletroforese em gel de agarose e sequenciamento. Assim, cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio de cultura líquido NB, e elas cresceram por 16 horas a 29°C, com agitação contínua de 180 rpm. Após este tempo, as células foram recuperadas por meio de centrifugação a 16.000 g por 2 min, sendo o “pellet” precipitado utilizado para extração de DNA genômico com o Kit da *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), segundo instruções do fabricante. Os DNAs foram quantificados no espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (“Thermo Fisher Scientific”), a partir do valor da absorbância a 260 nm, e diluídos para serem utilizados nas reações de PCR com os oligonucleotídeos A e D, como descrito no item 4.2.2 para amplificação do segmento A-D, com o produto sendo analisado em gel de agarose a 1%. O produtos de PCR dos clones que apresentaram o tamanho esperado do gene deletado foram submetidos ao sequenciamento, que foi realizado nas mesmas condições e mesmo sequenciador descritos no item 4.2.4, com a diferença de que, neste caso, utilizou-se 50 ng de produto de PCR (purificado dos reagentes da PCR) e os oligonucleotídeos A e D. Para os clones que tiveram confirmada a deleção da ORF selvagem XAC0024 e substituição pelo fragmento A-D, foram feitos estoques das respectivas colônias mutadas, tanto em glicerol a 15%, as quais foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C, como em água de torneira estéril, sendo estes últimos armazenados à temperatura ambiente.

4.2.9 Confirmação da identidade da Xac mutada

Um mutante da ORF XAC0024 (Δ XAC0024) foi escolhido para avaliar se o mesmo era procedente da estirpe *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 ou era um contaminante. Para isso, foi feito o sequenciamento de regiões da Xac mutante resultantes da amplificação com pares de oligonucleotídeos de regiões de interespaçadores de DNA ribossomal e de alguns genes constitutivos (“housekeeping”), utilizando o DNA do mutante como molde (“template”). A

comparação das sequências obtidas com as de Xac presente no banco de dados do NCBI foi feita através da ferramenta Blast (ALTSCHUL et al., 1990).

As extrações de DNA total e as PCRs para amplificação da sequência do DNA ribossomal, que inclui o gene 16S rDNA, a região intergênica (ITS) e um pequeno fragmento do gene 23S rDNA, e dos genes *atpD* (subunidade F1-F0 da síntese do ATP), *dnaK* (proteína de choque térmico, Hsp70) e *gyrB* (subunidade β da girase do DNA) do mutante Δ XAC0024 foram realizadas como descrito abaixo.

Uma alíquota do clone mutante Δ XAC0024 foi coletada de um dos estoques em água de torneira estéril, cultivada em placa de Petri com meio de cultura sólido NA e mantido a 29°C por 72 horas. Depois deste período, uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio de cultura líquido NB, mantida a 29°C a 180 rpm por 16 horas e as células foram submetidas à extração de DNA genômico com o Kit da Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), segundo instruções do fabricante. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 1000 (“Thermo Fisher Scientific”), a partir do valor da absorbância a 260 nm, sendo então diluído e utilizado nas reações de PCR para amplificação do DNA ribossomal (rDNA) e dos genes constitutivos.

Os oligonucleotídeos fD1 (WEISBURG et al., 1991) e 23r (LI; DE BOER, 1995) foram utilizados para amplificar a sequência do DNA ribossomal, incluindo o gene 16S rDNA, a região intergênica (ITS) e um pequeno fragmento do gene 23S rDNA. A reação de PCR continha 1 U de Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (“Thermo Scientific”), 1 X do tampão da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 20 ng de DNA genômico, com o volume completado com água ultrapura estéril para 20 μ L. O programa utilizado para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 98°C por 30 seg, seguido de 30 ciclos a 98°C por 10 seg, 55°C por 10 seg e 72°C por 50 seg, e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min.

As amplificações de regiões dos genes *atpD*, *dnaK* e *gyrB* foram conduzidas com os oligonucleotídeos descritos por Ah-you e colaboradores (2009). As reações foram realizadas com 1 U de Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (“Thermo Scientific”), 1 X do tampão da enzima, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 20 ng de DNA genômico e o volume completado com água

ultrapura estéril para 20 µL. O programa utilizado para as ampliações foi o mesmo para todos os pares de iniciadores, seguindo o seguinte protocolo: 98°C por 30 seg, 35 ciclos a 98°C por 10 seg, 68°C por 15 seg e 72°C por 15 seg, e 72°C por 10 min. Todas as ampliações foram realizadas em termociclador “Veriti® 96-Well Thermal Cycler” (“AB Applied Biosystems”). Os produtos gerados foram analisados em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo (10 mg/mL), e visualizados em luz ultravioleta. Os fragmentos de tamanho esperado foram purificados dos produtos de PCR utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e 50 ng do mesmo foram sequenciados em equipamento capilar automático ABI 3730 XL (“Applied Biosystems”) como descrito no item 4.2.4 com os pares de oligonucleotídeos respectivos de cada gene. Os cromatogramas foram trimados e analisados através do *Software Codon Code Aligner* versão 3.7.1. e *Bio Edit Sequence Alignment Editor*. As sequências obtidas foram comparadas com a sequência de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 previamente depositada no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do algoritmo blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> Blast).

4.3 Teste de patogenicidade em limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck)

O teste de patogenicidade do mutante ΔXAC0024 foi realizado em folhas de mudas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck) fornecidas pelo Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), cultivadas em vasos com capacidade de 20 litros. No ensaio, foi avaliada a linhagem mutante ΔXAC0024 frente à linhagem selvagem Xac 306. Para tanto, uma amostra das respectivas bactérias que estavam estocadas a -80°C foram plaqueadas separadamente em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NA e as placas foram mantidas a 29°C por 72 horas. Após este período de crescimento, uma massa de células bacteriana de cada placa foi coletada e diluída separadamente em água ultrapura estéril até que atingisse a densidade óptica de 0,3 a 600nm (inóculo), concentração equivalente a 10⁸ UFC/mL. Em seguida, três folhas jovens (repetições técnica) de três plantas diferentes (repetições biológica) foram inoculadas pela técnica de infiltração por seringa em dois pontos na parte abaxial das folhas; à esquerda da nervura central foi inoculado

a estirpe selvagem, enquanto que à direita foi inoculado o mutante, com o intento de comparação dos sintomas. Uma folha de cada planta foi inoculada apenas com água ultrapura estéril como um controle negativo.

As plantas inoculadas foram mantidas em laboratório de segurança concebido, sobretudo, para a manipulação e inoculação de *Xanthomonas*, localizado nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) da UNESP, Campus de Jaboticabal. Este local possui um sistema de filtragem absoluta do ar (filtros EPA) e pressão negativa, impedindo o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente, além de manter condições ótimas de temperatura (29°C), luminosidade (12 horas claro e 12 horas escuro) e umidade (em torno de 80%). A incidência da doença foi avaliada e registrada por meio de fotografia digital a cada 48 horas a partir do primeiro dia após a inoculação até o vigésimo primeiro dia, sendo que neste último dia, as folhas foram escaneadas.

4.4 Curva de crescimento bacteriano *in vitro*

Os isolados Xac 306 e o mutante Δ XAC0024 foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NA em estufa a 29°C por 72 horas. Depois deste período, três colônias isoladas da Xac 306 e do mutante (repetições biológicas) foram selecionadas, transferidas separadamente para 5 mL de meio de cultura líquido NB (pré-inóculo) e mantidas a 29°C a 180 rpm, até que atingissem a concentração de 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} igual a 0,3). Imediatamente, 500 μ L dos pré-inóculos foram transferidos separadamente para 50 mL de meio de cultura líquido NB (inóculo), contidos em *Erlenmeyers* independentes de 250 mL e mantidos a 29°C a 180 rpm, durante os tempos de coleta de 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 horas após a inoculação (hai). A cada tempo de coleta, 1 mL de cada cultura era transferido para uma cubeta e realizada a leitura da DO a 600nm no biofotômetro. Os dados de leitura foram utilizados para a obtenção da curva de crescimento *in vitro*.

4.5 Curva de crescimento bacteriano *in vivo*

Os isolados Xac 306 selvagem e o mutante Δ XAC0024 foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NA em estufa a 29°C por 72 horas. Depois deste período, uma colônia isolada de cada bactéria (selvagem e mutante) foram selecionadas e plaqueadas em uma nova placa de Petri contendo meio de cultura sólido NA para obtenção de grande quantidade de massa bacteriana, com as placas sendo mantidas em estufa a 29°C por 48 horas. Após o crescimento, uma massa de células bacteriana de cada placa (selvagem e mutante) foi coletada e diluída separadamente em água ultrapura estéril, até que atingisse a concentração de 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} igual a 0,3). A seguir, uma diluição seriada foi feita para padronizar os inóculos na concentração de 10^6 UFC/mL.

Em seguida, dez folhas jovens homogêneas de três mudas de limão cravo foram inoculadas por infiltração em 4 pontos da parte abaxial das folhas. As mudas se encontravam no Laboratório de Plantas, localizado nas dependências do LBM (UNESP/FCAV), local com boa climatização (29°C), luminosidade (12 horas claro e 12 horas escuro) e umidade (em torno de 80%). Posteriormente, 4 discos foliares de 1 cm de diâmetro foram coletados dos pontos em que havia sido aplicado o inóculo, sendo então macerados em almofariz com 1 mL de tampão PBS a 1X (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 , 0,24 g/L de KH_2PO_4 , pH 7,4) e passados para microtubos de 1,5 mL estéreis. Em seguida, 50 μ L das amostras foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NA e as placas foram mantidas a 29°C por 72 horas.

Este processo foi realizado nos tempos 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 25 dias após inoculação (DAI), para as duas bactérias (selvagem e mutante) e nas três plantas (réplicas biológicas), totalizando 24 discos por coleta, sendo que, a partir do tempo 3 (dai 3), diluições seriadas foram feitas com a finalidade de ser possível contar o número de colônias isoladas, e 50 μ L das diluições foram plaqueadas em meio de cultura sólido NA. Após o período de incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônias de cada placa e efetuado os cálculos para a obtenção da curva de crescimento *in vivo*.

4.6 Ensaio de autoagregação

Os isolados bacterianos Xac 306 selvagem e o mutante Δ XAC0024 foram crescidos por 16 horas a 29°C em 10 mL de meio de cultura líquido NB, em tubos tipo Falcon de 50 mL, quando então a DO dos mesmos a 600nm foi ajustada para o menor valor ($DO_{600nm} = 2,529$), e amostras de 10 mL de cada cultura foram transferidas para tubos de ensaio tipo borosilicato estéreis de 20 mL. Inicialmente as culturas foram agitadas vigorosamente por 15 seg e uma amostra de 100 μ L (tempo zero) foi retirada de cada tubo na altura de 1 cm do topo da cultura e adicionada a 900 μ L de meio de cultura líquido NB (diluição de 10 vezes). A densidade óptica foi avaliada a 600nm e multiplicada por 10. Os tubos permaneceram estáticos durante todo o experimento e, a cada 1 hora, uma nova diluição igual a anterior foi feita e avaliada da mesma maneira. Foram retiradas amostras e realizadas leituras até o tempo de 12 horas decorridas do início do experimento. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado bacteriano.

4.7 Ensaio de formação de biofilme

A quantidade de biofilme formado pelas linhagens Xac 306 (selvagem) e Δ XAC0024 (mutante) foram obtidos de acordo com ensaios realizados por Yan e Wang (2011), com algumas modificações. As bactérias acima citadas foram plaqueadas em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido NA e mantidas a 29°C por 48 horas. Em seguida, 5 colônias isoladas de cada bactéria foram transferidas separadamente para 5 mL de meio de cultura líquido XVM2 (20 mM NaCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0,16 mM KH_2PO_4 , 0,32 mM K_2HPO_4 , 0,01 mM $FeSO_4$, 10 mM frutose, 10 mM sacarose e 0,03% de casaminoácidos, pH 6.7) e mantidas em crescimento até que atingissem a DO_{600nm} de 0,3 (10^8 UFC/mL). Após esse período, os inóculos foram diluídos para uma concentração de 10^6 UFC/mL, e 1 mL destas suspensões foram transferidas para tubos de ensaio tipo borosilicato estéreis de 10 mL e mantidos sem agitação por 48 horas a 29°C. O biofilme formado nos tubos foi visualizado por coloração com 0,1% de cristal violeta por 10 minutos, seguido de lavagem com 1 mL de água ultrapura

estéril por 2 vezes. As células fixadas com o corante foram dissolvidas em 1 mL de etanol a 95% e quantificadas por espectrofotometria a 590nm (DO_{590nm}). As médias das cinco repetições foram utilizadas para confrontar a produção de biofilme da linhagem selvagem Xac 306 com a do mutante $\Delta XAC0024$ e os resultados foram analisados pelo programa “ASSISTAT”, teste *t* a 0,05 ou 0,01 de significância.

4.8 Extração e quantificação de goma xantana

As linhagens Xac 306 e $\Delta XAC0024$, estocadas à temperatura ambiente em água de torneira estéril, foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NA e cultivadas em estufa a 29°C por 48 horas. Posteriormente, quatro colônias isoladas de cada linhagem foram inoculadas separadamente em 10 mL de meio NB contidos em tubos tipo Falcon de 50 mL, estéreis, e incubadas a 29°C a 180 rpm por, aproximadamente, 17 horas. Em seguida, estas oito culturas foram ajustadas para a DO_{600nm} de 0,3 e utilizadas como inóculo para a produção de goma xantana. Para isso, 2,5 mL de cada uma das oito culturas bacterianas foram inoculados em oito *Erlenmeyers* de 250 mL, respectivamente, contendo cada um 100 mL de meio goma xantana (25 g/L de glicose, 3 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de K_2HPO_4 , 0,1 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, corrigido para o pH 7,0 com HCl 4 M) e incubados a 29 °C, a 180 rpm, durante 96 horas. Após este tempo, as células em cultura foram centrifugadas a 9,666 x g a 4°C por 40 min em oito tubos de centrífuga previamente limpos. Os “pellets” bacterianos foram ressuspensos em 1 mL de H_2O bidestilada autoclavada, transferidos para béquers de vidro com peso conhecido e pesados novamente após 24 horas a 70°C para o cálculo do peso celular seco. Já os sobrenadantes foram transferidos para béquers de 500 mL, nos quais, em cada um, foram dissolvidos 4 g de KCl por agitação durante 15 min e adicionado o dobro do volume de isopropanol gelado para a precipitação da goma. A extração da goma foi realizada com a ajuda de um bastão de vidro limpo, ao qual a goma se aderiu conforme era agitado com movimentos circulares. A goma aderida ao bastão foi transferida, com a ajuda de uma peneira, para copos de plásticos de pesos conhecidos, os quais foram pesados novamente após 72 horas a 37°C para o cálculo da quantidade da goma seca. A quantidade de goma produzida, dividida pela

matéria seca correspondente, fornece a quantidade de goma produzida pela quantidade de bactéria presente no meio de cultura. Os resultados foram analisados pelo programa "ASSISTAT", teste *t* a 0,05 ou 0,01 de significância.

4.9 Análise da frequência e diversidade da ORF XAC0024 presente nos bancos de dados

Para verificar a relação da proteína XAC0024 com proteínas de outros organismos por meio da análise de frequência e diversidade, foi realizada a comparação da sequência proteica de XAC0024 contra sequências depositadas em bancos de dados de proteínas. Para isso utilizou-se a ferramenta blastp (protein blast), com o retorno máximo dos resultados ajustados para 20.000 no NCBI e a ferramenta InterPro.

5 RESULTADOS

5.1 Mutação sítio-dirigida da ORF XAC0024

A ORF XAC0024 contém 1.236 pares de bases. Desconsiderando-se o peptídeo sinal (60 pb) para realização da mutação, a ORF possui 1.176 pares de bases que, após eliminação da região central de 593 pares de bases, passou a ter 583 pares de bases (309 pb do segmento A-B mais 274 pb do segmento C-D) (Figura 9). Como tanto o fragmento A-B como o fragmento C-D tem uma cauda complementar de 9 bases, seus tamanhos individuais na PCR é de 318 e 283 pb, respectivamente.

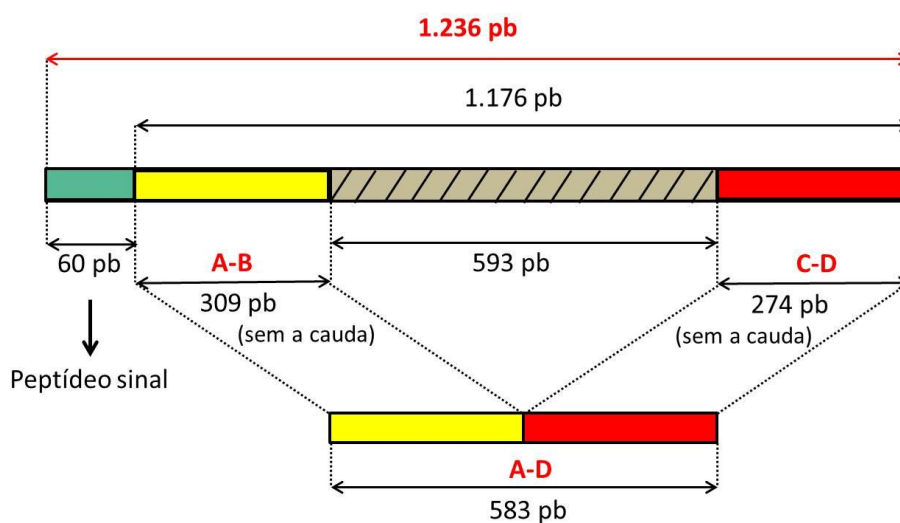


Figura 9. Diagrama esquemático da ORF XAC0024, mostrando a região de deleção com os respectivos fragmentos de DNA A-B e C-D que, quando unidos, formam o fragmento A-D.

Os fragmentos A-B e C-D obtidos na PCR primária e o fragmento A-D obtido na PCR de ligação, apresentaram os tamanhos esperados, ou seja, 318 pb para A-B, 283 pb para C-D e 583 pb para A-D (Figura 10).

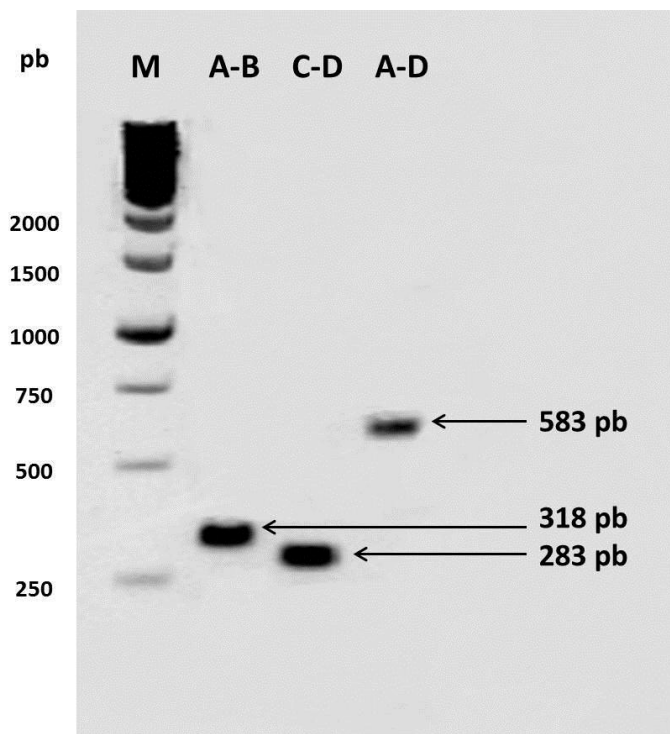


Figura 10. Produtos resultantes das PCRs primárias (A-B e C-D) e de ligação (A-D). M: Padrão de peso molecular (“GeneRuler™ 1kb DNA Ladder”, Fermentas). Gel de agarose 1% (m/v) corado com brometo de etídio (10 mg/mL).

Na clonagem do fragmento AD no vetor pGEM-T Easy foram obtidos dois clones da estirpe bacteriana *E. coli* DH10B, sendo que o produto da PCR do plasmídeo de cada um destes clones revelou-se positivo para os dois clones, tendo eles amplificado o inserto mutado do tamanho esperado e apresentado a sequência nucleotídica correta depois do sequenciamento e das análises *in silico*.

Após a digestão com as enzimas de restrição *Apal* e *SalI*-HF do DNA plasmidial pGEM-T Easy de um dos dois clones positivos escolhido, o resultado foi evidente pela imagem do gel de agarose “low-melting” 0,8%, no qual foi feito um “pull” deste clone e o mesmo foi dividido em quatro poços diferentes (Figura 11A), revelando bandas de tamanho de 666 pb, já que agora o fragmento mutado de 583 pb continha em suas extremidades parte da sequência do vetor de clonagem pGEM-T Easy que flanqueiam os sítios das enzimas de restrição. O fragmento de 666 pb foi

clonado no vetor suicida pOK1 (7.000 pb), também digerido com as mesmas enzimas, passando a ter 6.758 pb, e transformado em cepas de *E. coli* SM10 λ pir. Este passo foi adicionado para que se pudesse confirmar a ligação do inserto mutado em pOK1. Com isso, foram obtidos cinco clones resistentes ao antibiótico espectinomicina, sendo que dois deles continham o fragmento A-D (construção Δ XAC0024-pOK1), que foi revelado através da PCR com os oligonucleotídeos A e D sobre o DNA plasmidial pOK1 (Figura 11B) e confirmado por meio de sequenciamento e análises *in silico*, o qual apontou sequências idênticas ao inserto mutado.

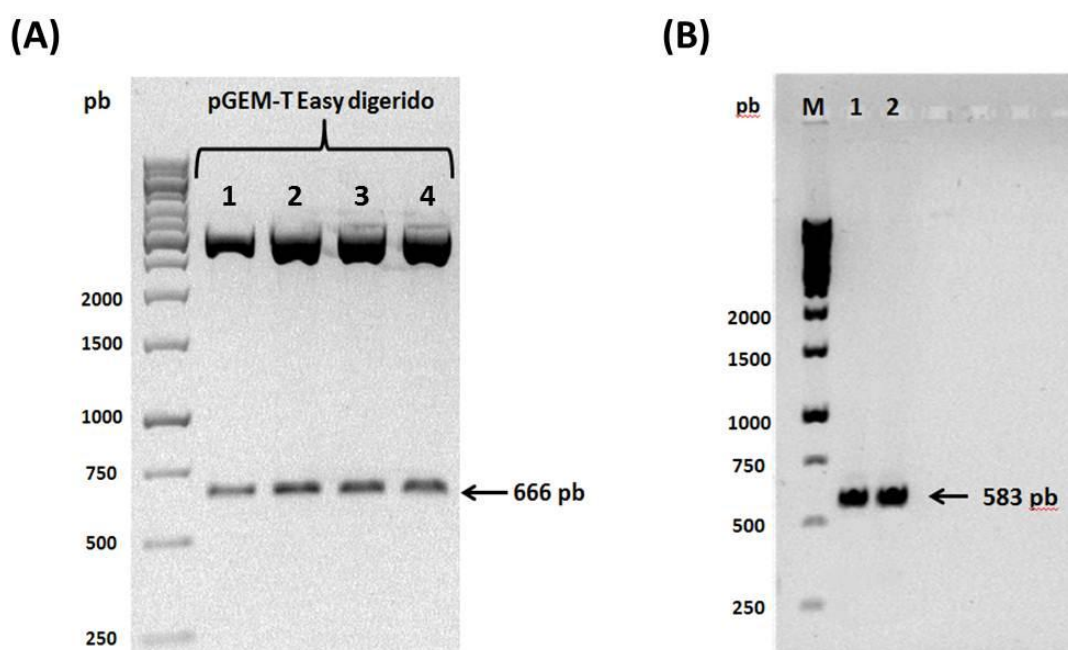


Figura 11. Géis de eletroforese em agarose. (A) Vetor pGEM-T Easy digerido com as enzimas de restrição *Apal* e *SalI*-HF. 1, 2, 3, 4: “Pull” de um dos clones obtido após a transformação, contendo o fragmento A-D clonado e dividido em quatro poços no gel de agarose. M: Padrão de peso molecular (“GeneRuler™ 1kb DNA Ladder”, Fermentas). (B) Produtos de PCR do fragmento A-D clonado em pOK1 transformado em *E. coli* SM10 λ pir. 1, 2: Clones diferentes obtidos após a transformação e contendo o fragmento A-D clonado. M: Padrão de peso molecular (“GeneRuler™ 1kb DNA Ladder”, Fermentas).

Os dois clones com a construção Δ XAC0024-pOK1 foram empregados separadamente na transformação por eletroporação de Xac 306, com objetivo de aumentar a chance de um resultado positivo. As duas transformações originaram por volta de 150 colônias, com média de aproximadamente 15 colônias por placa.

Destas, foram selecionadas, aleatoriamente, 20 colônias para confirmação da mutação, sendo que cinco apresentaram o fragmento mutado de tamanho esperado, de 583 pb, quando o DNA genômico foi utilizado como molde para reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos A e D como iniciadores. O produto de PCR de uma delas foi sequenciado com os mesmos oligonucleotídeos utilizados na PCR, o qual confirmou. O alinhamento múltiplo da sequência da ORF XAC0024, da sequência A-D obtida neste clone 1 sequenciado e do DNA genômico de XAC 306, realizado através do algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) da “National Center for Biotechnology Information”, confirmou a presença da deleção na ORF XAC0024 (Figuras 12 e 13). Este clone é, portanto, um mutante por deleção da ORF XAC0024 (Δ XAC0024).

ORF XAC0024

```

ATGTGGCTGGCGGTGGGCGTGGCTGGCCCTGCACCTTGCTGGGCGAGCATGGGCGCAAGCGCGCAGAGCCAGC
GGGAGACCGAGCGCAAATTGCAGCAGCTGCGCGATGAGCTCAAGACCATCAGCGCCGATCGACGCGAACT
GGAAGGCAAGCGCGGCACCGCCGCGCAACAGTTGCGCCAGGCCGACGAGAAAGTGGCCAAGACCGCACGT
GCATTTAGCGAGACCGAAGCGGCGATGCGCGCGCAGGAACAGCATCTGTCCACCCTCGAGCAGGAACGCG
CGCAATTGCAGCGCGGCTGCAGAACCAGCGCGCGCAGCTGGCGGCGTTATTGCGCGCCGCGATCAGGT
GGGCGCAATGCACCGCTGAAGGTGCTGCTGTCGCGAGGACACGGTGGGCGATGCCACGCGTATGCTGGCC
GATCACCGCTATGTGCAAAACGCACGCGCGCAGCGCATCCACGCCCTGACCACGCAACTGGATGCCCTGG
CGCAGTTGGAACAGGACATCGCCACCCGCGCGAGGCGTGGATGCCGCGCGTGGCAAAAAGCGCA
GGCGGCCACGTTGCAGAAGGATCGCTCGCAACAGGGGCCACCGTCGCGCAGCTGGACGATCGCTACAAA
CAGCGCGCCGAGCGCGAAAAGGCAATCGGCCAGGACGCCAAGGCGCTGGAAACAATGCTCGCCAACTGTC
GCGCGGCCGCGCCAAAGGCGGAAGCGGAACGCGCGCTGCCGCCAGACGCGCCGCGCGGAAGCCGCGC
ACAGGCCAAGCGCAGCAAAACCGAGCGTTCCGATCGCCCGGCAAGACGCCATCCAAGGTAGTCGCCAAC
GCACCGGCCCCCAAGGTCGGTGGGCTCAGCTGGCCGGTGGCGGGCAATCTGCTGGCGCGCTTCAATGCCA
CCTTGGCCGATGGCCACACCAGCAAGGCGTGTGATCGGCGCGCCCAAGGGCACCACCGTGACTGCAGT
GGCCGATGGCACGGTGGTGTTCCTCGACTGGATGACCGGCTACGGCATGATCCTGATCGTGGACCACGGC
AACGGCTACATGAGCCTGTACGCGCATAACGACACCTTGCTGCGCGATGCCGGCGCAACGATCAACGTTG
CAGCGCGTGGCCAAAGTTCGGCAGTTGGGCGGGCAGGGCGTGCAGCGCGTGTACTTCGAATTGGCTCG
CAACGGGCAGCCGGTGGATCCATCCAGCTGGCTGCAACGCGCGCTG

```

Proteína

```

MWLAVGLACTLLGSMGASAQSQRETERKQLQRLDELKTI SADRRELEKGRGTAQQLRQADEKVAKTAR
ALSETEAAMRAQEQHLSTLQQERAQLQRGLQNQRAQLAALLRAADQVGRNAPLKVLLSQDVTGDA TRMLA
DHRYVQNRARAQR IHALTQLDALATVEQDIATRRLQALDAARAQQKAQAATLQKDRSQQAAATVAQLDDRYK
QRAEREKAI GDAKALEQLLANLRAAAAKAEAEERRAAARRAAEAAAQAKRSKTERS DRPGKTPSKVVAN
APAPKVGGLSWPVAGNLLARFNATLPDGHTSKGVLI GAPKGTTVTAVADGTVV FSDWMTGYGMILIVDHG
NGYMSLYAHNDTLLRDAGATI KRGDVAVKVSSGGQV PALYFELRRNGQPVDPSWLRQR

```

BlastP

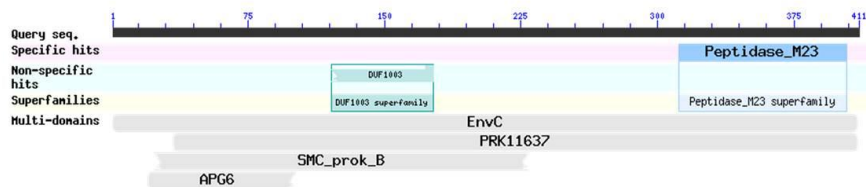


Figura 12. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos em formato FASTA da ORF XAC0024 completa presente no *Genbank*, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A sequência de nucleotídeos compreendida entre os oligonucleotídeos B (amarelo) e C (azul) foi deletada.

ORF XAC0024 Truncada

```

ATGTGGCTGGCGGTGGGCGTGTGGCCTGCACCTTGTGGGCAGCATGGGCGCAAGCGCGCAGAGCCAGCGCG
AGACCGAGCGCAAATTCGAGCAGCTGCGCGATGAGCTCAAGACCATCAGCGCCGATCGACGCGAACTGGAAGG
CAAGCGCGCACCCGCGCAACAGTTGCGCCAGGCCGACGAGAAAGTGGCCAAGACCGCACGTGCATTGAGC
GAGACCGAAGCGCGGATGCGCGCGCAGGAACAGCATCTGTCCACCCTGCAGCAGGAACGCGCGCAATTGCAGC
GCGGCCTGCAGAACCAGCGCGCGCAGCTGGCGGCGTTATTGCGCGCCGCGATCAGGTGGGCGCAATGCACC
GCTGCACCACCGTGACTGCAGTGGCGGATGGCACGGTGGTGTGTTTCCGACTGGATGACCGGCTACGGCATGAT
CCTGATCGTGGACCACGGCAACGGCTACATGAGCCTGTACGCGCATAACGACACCTTGTGCGCGATGCCGGC
GCAACGATCAAACGTGGCGACGCGGTGGCCAAGGTCGGCAGTTCGGGCGGGCAGGGCGTCCCGCGCTGTACT
TCGAATTGCGTCGCAACGGGCAGCCGGTGGATCCATCGAGCTGGCTGCAACGGCGCTGA

```

Proteína truncada (ORF Finder)

```

MWLAVGVLACTIONLLGSMGASASQRETERKLOQLRDELKTI SADRRELEKRGRTAAQQLRQADEKVAKTAR
ALSETAAMRAQEQHLSTLQOERAQLORGLQNRQAQLAALLRAADQVGRNAPLHHRDCSGRWHGGVFRDL
DRLRHDPDRGPRQRLHEPVRA

```

BlastP

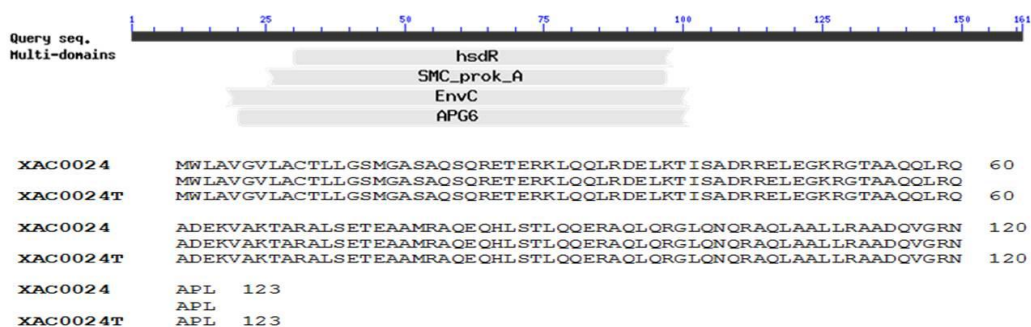


Figura 13. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos em formato FASTA da ORF XAC0024 truncada. A sequência da proteína codificada pela ORF truncada foi obtida utilizando o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). A ausência do domínio peptidase M23 na proteína codificada pela ORF truncada foi verificada utilizando o algoritmo blastP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A análise do DNA ribossomal, que inclui o gene 16S rDNA (1498 pb), a região intergênica (ITS) (513 pb) e um pequeno fragmento do gene 23S rDNA (24 pb), e dos genes *dnaK* (762 pb) e *gyrB* (773 pb) amplificados da sequência da Xac mutante revelaram 100% de identidade quando comparados com genoma de Xac 306 previamente depositado no GenBank. Apenas o gene *atpD* (747 pb) revelou 99% de identidade ao ser comparado. Conclui-se com estes resultados que, este clone é, portanto, um mutante advindo da espécie *Xanthomonas citri* subsp *citri* linhagem 306 e, por isso, foi utilizado nos experimentos de avaliação funcional da ORF.

5.2 Ensaio de patogenicidade em limão cravo (*Citrus limonia* Osbek)

Os ensaios de patogenicidade em folhas jovens de limão cravo mostraram que o mutante Δ XAC0024 diminuiu a virulência quando comparado à linhagem selvagem Xac 306. A partir do 3º DAI (Dia Após a Inoculação) foi possível observar início de sintomas de cancro cítrico, com um leve escurecimento nos pontos de inoculação com o isolado selvagem, porém para o mutante não foi possível observar sinal algum (Figura 14). Ao 7º DAI, foi possível observar hiperplasia espalhada por todo o lóbulo, com amarelecimento nas bordas da lesão e hipertrofia, propiciando um aspecto corticoso na superfície foliar, além de sintomas de encharcamento para o isolado selvagem. Por outro lado, no mutante Δ XAC0024 os sintomas de cancro estavam apenas começando, com escurecimento nos pontos inoculados e pequenos sinais de amarelecimento na parte adaxial da folha. A partir do 11º DAI em diante, o fenótipo observado para o isolado selvagem foi, além dos já relatados, necrose com rachaduras em alguns pontos, sinalizando morte do tecido vegetal, enquanto no mutante Δ XAC0024 foi observado hiperplasia, amarelecimento e necrose em pequena proporção até o 25º DAI.

Em suma, os sinais e sintomas de cancro cítrico ocasionados pelo mutante Δ XAC0024 foram muito menos severos do que os ocasionados pela Xac selvagem. A mutação resultou no atraso e diminuição do desenvolvimento dos sintomas, com menor expansão a partir do ponto de inoculação e ausência de hipertrofia com lesões corticosas. Estes resultados indicam a importância da ORF XAC0024 para a virulência da bactéria.

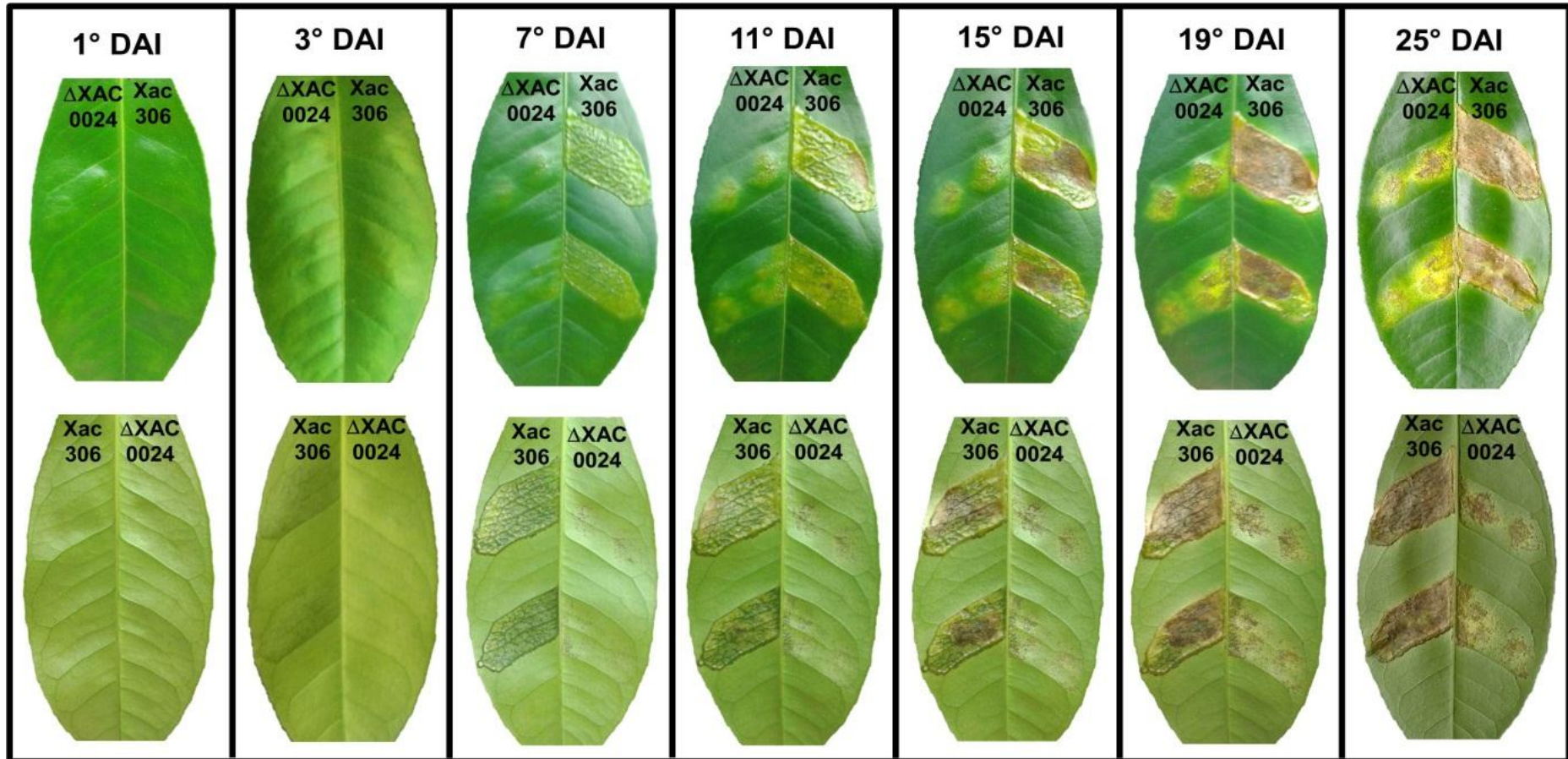


Figura 14. Teste de patogenicidade. Sintomas observados no 1°, 3°, 7°, 11°, 15°, 19° e 25° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xac* 306 selvagem e mutante Δ XAC0024 na superfície adaxial (folhas superiores no quadro) e abaxial (folhas inferiores no quadro) de folhas jovens de limão cravo. As duas linhagens bacterianas foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC/mL.

5.3 Crescimento bacteriano *in vitro* e *in vivo*

A curva de crescimento bacteriano em folhas de limão cravo, avaliada em oito tempos de coleta, revelou que a mutação na ORF XAC0024 reduziu bastante a capacidade de desenvolvimento da bactéria *in vivo* (Figura 15A). O mutante Δ XAC0024 conseguiu se multiplicar só até o 10 DAI e, além disso, com a capacidade consideravelmente reduzida quando comparada à linhagem Xac 306 selvagem, apresentando quantidade de células 10.000 vezes menor que Xac 306, de 10^4 para 10^8 , respectivamente. Depois do 10 DAI o mutante começou a decair em quantidade de células. Desse modo, o desenvolvimento dos sintomas produzidos pelo mutante Δ XAC0024 é reduzido, provavelmente, devido ao crescimento limitado da bactéria dentro do mesófilo do hospedeiro.

Por outro lado, a velocidade de crescimento das duas linhagens foi semelhante em meio de cultura líquido NB (Figura 15B). Estes resultados indicam que a ORF XAC0024 possui uma função fundamental no desenvolvimento e virulência da Xac quando se encontra no hospedeiro cítrico, mas ela não é essencial para o seu desenvolvimento *in vitro* na presença de meio rico.

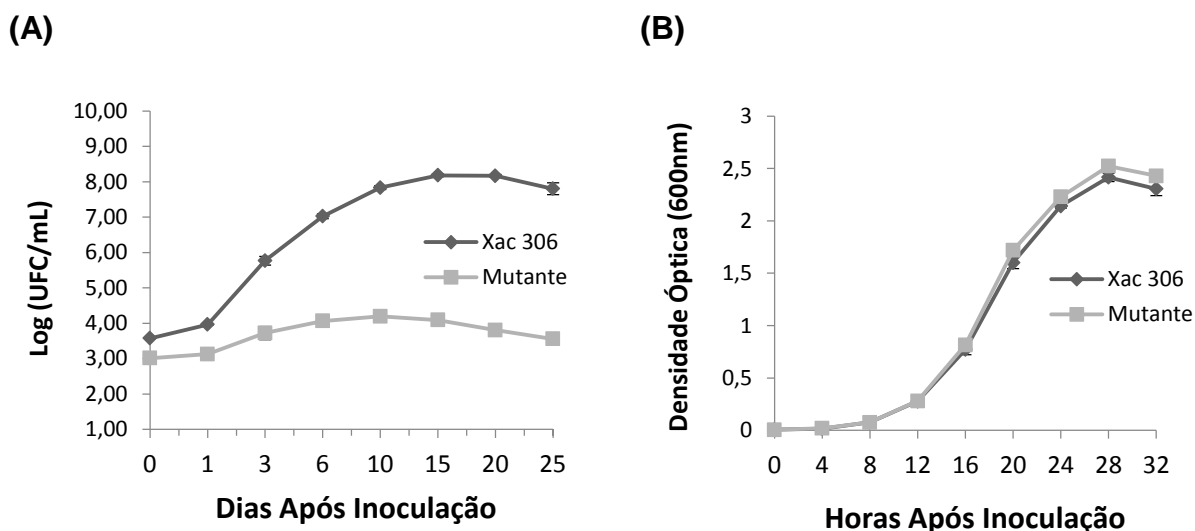


Figura 15. (A) Curva de crescimento *in vivo* das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem e do mutante Δ XAC0024 em folhas de *Citrus limonia*. (B) Curva de crescimento *in vitro* das mesmas linhagens, porém, inoculadas em meio de cultura líquido NB.

5.4 Ensaio de agregação célula a célula

O ensaio de agregação célula a célula realizado com os dois isolados bacterianos revelou uma associação bem mais rápida entre as células de Xac 306 selvagem quando comparada com as do mutante (Figura 16). No intervalo de 1 hora decorrido a partir do tempo 0, foi evidente a visualização de um precipitado se formando no fundo dos tubos de ensaio do isolado selvagem e de uma região límpida se formando na altura de 1 cm do topo da cultura (Figura 17), fato que também foi comprovado quando os dados de absorvância da parte superior das soluções foram colocados em gráfico (Figura 16). O gráfico demonstrou uma queda abrupta no intervalo de 0 a 1 hora para Xac 306 selvagem e um decréscimo bem lento e constante das barras a partir de 1 hora em diante. Por outro lado, no intervalo de tempo 0 a 1 hora, os tubos do mutante exibiram uma aparência turva em toda a extensão do tubo (Figura 17), revelando que a maioria de suas células permaneciam dispersas. Este fato também foi constatado quando os valores de absorvância da parte superior da solução dos tubos foram colocados em gráfico (Figura 16). Para o mutante, somente a partir de 8 horas é que há diferença estatística em relação ao valor do tempo zero, enquanto que para a Xac 306 selvagem já há diferença a partir de 1 hora (Figuras 16). Após 12 horas, é visível a olho nu a diferença entre os dois isolados (Figura 17).

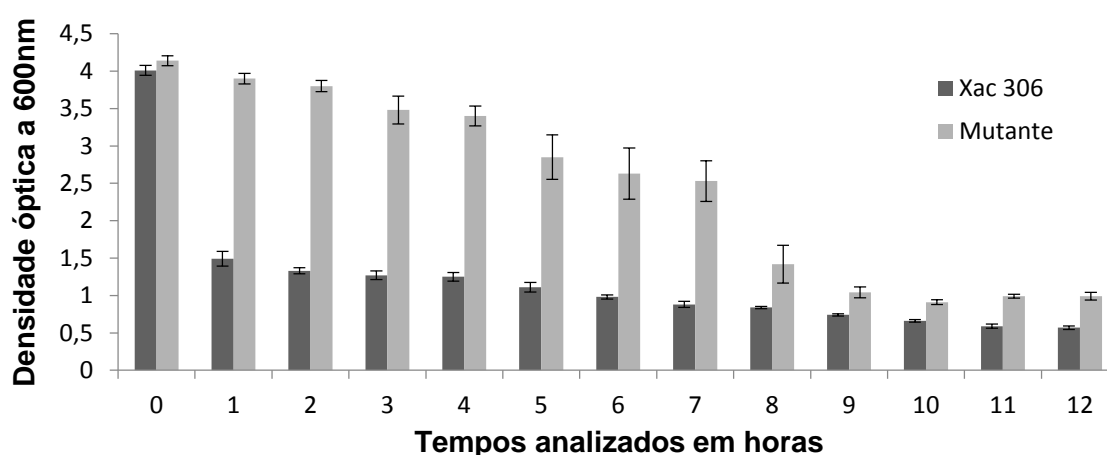


Figura 16. Ensaio de agregação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e do mutante Δ XAC0024 no período de 12 horas.

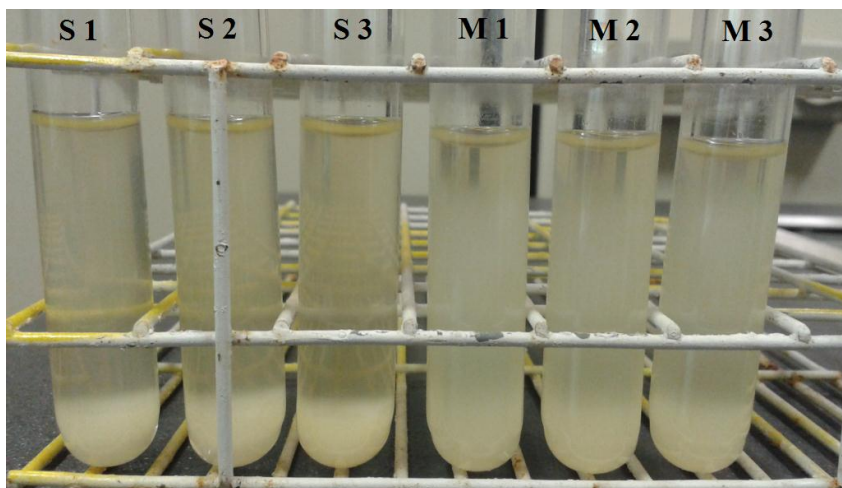


Figura 17. Ensaio de agregação do isolado selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (S1, S2 e S3) e do mutante desta linhagem Δ XAC0024 (M1, M2 e M3) após 12 horas em repouso. Cada linhagem está exibida em triplicata.

5.5 Formação de biofilme

Para examinar o efeito da deleção da ORF XAC0024 de Xac 306 na produção de biofilme, este foi mensurado pela multiplicação das linhagens selvagem e mutante em tubos de borosilicato, por 48 horas, como descrito em Material e Métodos. O mutante Δ XAC0024 não demonstrou alteração significativa na formação de biofilme em relação à Xac selvagem, segundo análise estatística pelo teste *t* a 1% e 5% de probabilidade (Figura 18).

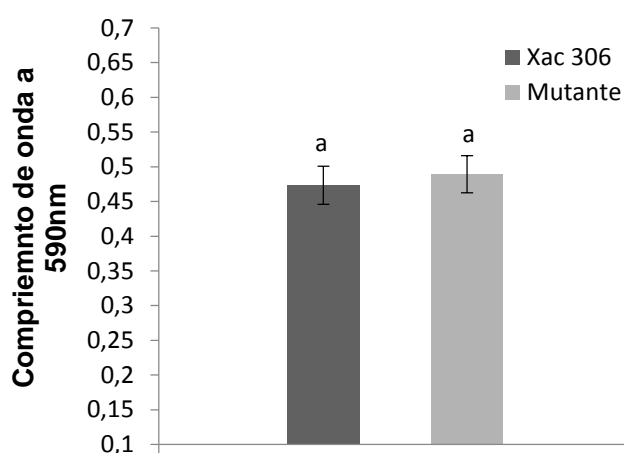


Figura 18. Formação de biofilme pelas linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem e mutante Δ XAC0024 em tubos de vidro tipo borosilicato. O experimento foi realizado com cinco replicatas e os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão.

5.6 Produção de goma xantana

A produção de goma xantana pela Xac selvagem e pelo mutante $\Delta XAC0024$ está apresentada na Figura 19A. Embora a Xac selvagem produza uma quantidade total de biomassa maior do que o mutante $\Delta XAC0024$ (Figura 19A), a quantidade de goma produzida por massa de bactéria é bem maior no mutante do que na Xac selvagem (Figura 19B). Análise pelo programa “ASSISTAT” demonstrou que o mutante $\Delta XAC0024$ apresentou uma diferença de 20,41% a mais de goma produzida por bactéria em relação a linhagem selvagem. Essa diferença foi estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade quando as médias foram comparadas pelo teste *t* (Figura 19B). Esses resultados indicam que o mutante $\Delta XAC0024$ produz uma maior quantidade de goma xantana por biomassa do que a Xac selvagem.

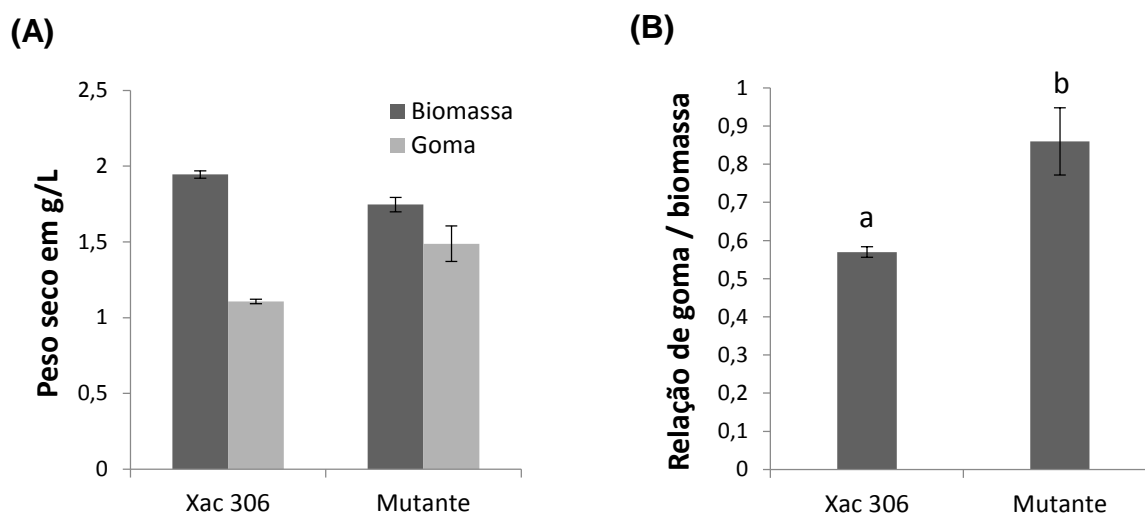


Figura 19. (A) Concentração de biomassa e goma, em g/L, produzida por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e pelo mutante $\Delta XAC0024$. (B) Relação de goma/biomassa em cada linhagem bacteriana.

5.7 Análise da frequência e diversidade da ORF XAC0024 presente nos bancos de dados

A análise comparativa da sequência proteica de XAC0024 contra sequências encontradas em bancos de dados revelou uma ampla gama de proteínas pertencentes principalmente ao filo *Proteobacteria*, dentro do Domínio *Bacteria*, que possuem alta identidade com a sequência de interesse. Secundariamente, também foram encontradas sequências proteicas que têm alguma similaridade com a ORF XAC0024 nos filios *Bactérias Gram positivas*, *Actinobactéria*, *Cianobactérias*, *Cytophaga*, *Flavobactérias*, *Espiroquetas*, *Deinococos*, *Thermotoga* e *Aquifex* (NCBI, 2016) (Figura 20).

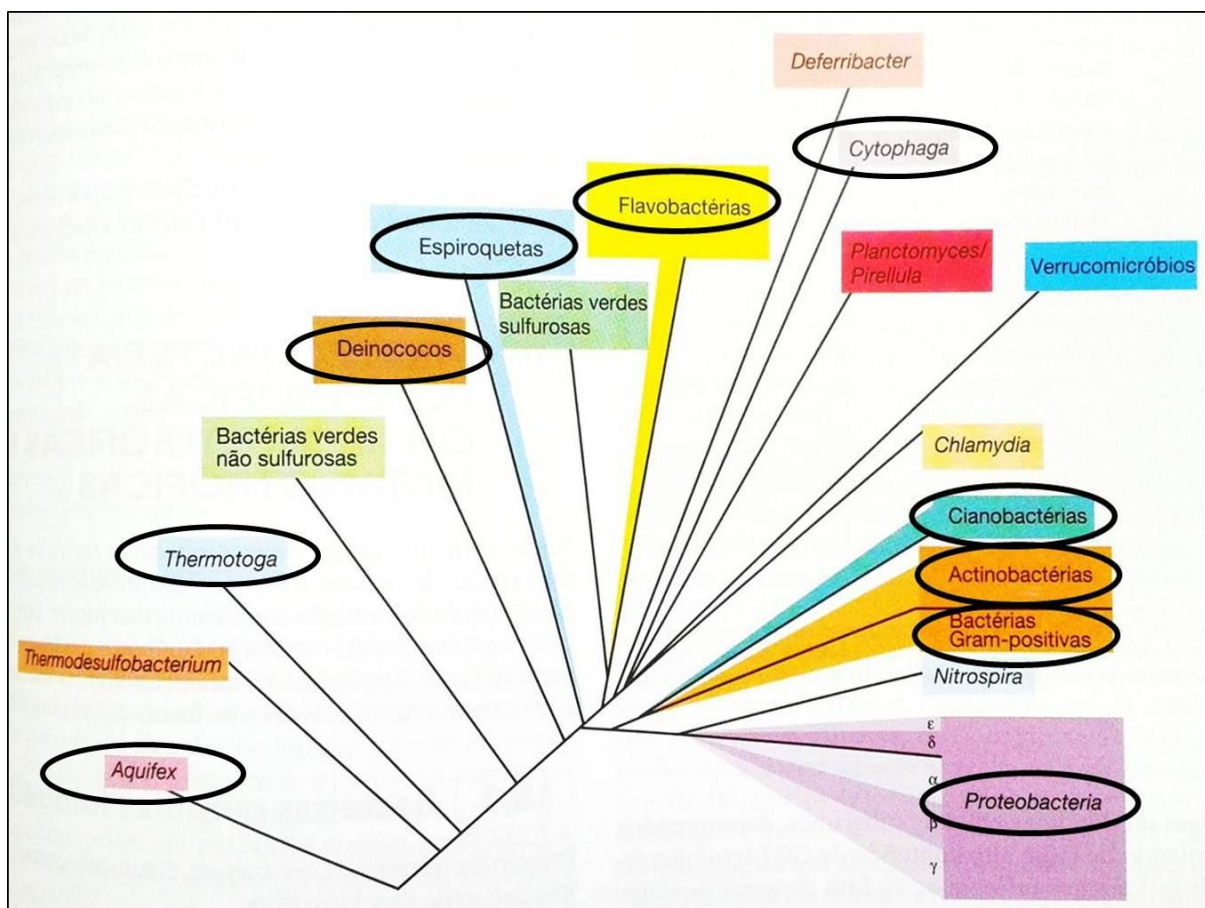


Figura 20. Árvore filogenética do Domínio Bacteria. Os círculos pretos indicam os filios de bactérias cujas proteínas apresentaram similaridade com a proteína XAC0024. Fonte: (MADIGAN et al., 2010).

Constatou-se que muitas sequências apresentadas nos resultados referem-se a proteínas hipotéticas, ou seja, que ainda não possuem uma função determinada, com as quais não é possível realizar inferências com confiabilidade, como, por exemplo, proteínas hipotéticas de *Xanthomonas citri* pv. *citri*, *Neisseria meningitidis*, *Deinococcus radiodurans* R1, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* A3, *Thermogota marítima* MSB8, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, entre milhares de outras (NCBI, 2016).

Os dados gerados através da ferramenta BlasP do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) para a ORF XAC0024, utilizando o banco de dados “non-redundant protein sequences (nr)”, indicaram que as primeiras 134 proteínas peptidases M23 existem em espécies e isolados diferentes do gênero *Xanthomonas*, sendo que todas elas compartilham uma identidade de no mínimo 89% e uma cobertura de no mínimo 90%. A partir da proteína 135 (peptidase M23 de *Stenotrophomonas panacihumii*) em diante, todas as sequências se apresentam com no máximo 69% de identidade, caindo progressivamente até a sequência de 20.000 (valor de retorno dos resultados programado no blasP), porém, a cobertura de milhares delas se manteve alta, de 70% a 90%, fazendo parte de bactérias, seguindo por ordem de identidade, *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas* spp. (vários isolados) e *Lysobacter* spp. (NCBI, 2016).

Em virtude da ampla cobertura de espécies bacterianas que há dentro dos filos aqui mencionados onde foram encontradas proteínas relacionadas à XAC0024, esta pode ser considerada uma proteína ortóloga e extremamente conservada, ou seja, não específica de Xac. Além disso, ao utilizar a sequência nucleotídica da ORF XAC0024 e realizar um Blastn contra o genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (306), foi encontrada apenas uma sequência com 100% de identidade no genoma inteiro, que foi a própria XAC0024. Isso demonstra que não há sequências parálogas de XAC0024 no genoma de Xac 306. Isso é uma indicação de que a recombinação homóloga deve ter ocorrido na ORF XAC0024, produzindo assim o mutante Δ XAC0024.

6 DISCUSSÃO

Vários estudos têm sido realizados buscando identificar genes alvos responsáveis por ou participantes dos processos desencadeadores da patogenicidade de Xac em citros. Os trabalhos de Laia (2007) e de Laia et al (2009) sugeriram a possibilidade de várias ORFs hipotéticas, ou seja, que codificam proteínas sem função conhecida até o momento e que podem estar envolvidas com a patogenicidade da Xac. A ORF XAC0024 poderia ser uma delas, embora ela não tivesse sido caracterizada como tal.

Quando se trata de caracterizar a função de um gene, a mutagênese sítio-dirigida é uma valiosa ferramenta e tem sido utilizada para analisar a função de genes com função ainda desconhecida (HUGUET et al., 1998; RIED; COLLMER, 1987; JING; FENG, 2015; KANIGA; DELOR; CORNELIS, 1991; MILLER; MEKALANOS, 1988). Assim, a mutagênese sítio-dirigida foi utilizada no presente trabalho para deletar parte da ORF XAC0024 do genoma de Xac e verificar as alterações no fenótipo e em outras características relacionadas à virulência em relação à Xac selvagem. A ORF XAC0024 contém alguns domínios preditos, entre eles o da peptidase M23, que pode estar envolvido na virulência da Xac 306.

As peptidases estão distribuídas em seis grupos principais com base na estrutura catalítica do processo hidrolítico: cisteína proteases, serina proteases, treonina proteases, metalo proteases, aspartilo proteases e as peptidases com mecanismos desconhecidos (RAWLINGS; BARRETT, 1993; BARRETT; RAWLINGS; WOESSNER, 2004). O domínio Peptidase M23 consiste de uma superfamília de metalopeptidases caracterizadas pela presença do zinco no sítio ativo da enzima e dependentes deste sítio catalítico para exercer sua função (WU et al., 1990). Nesta família, estão incluídas as endopeptidases Gli-Gli e algumas lipoproteínas bacterianas, como o ativador NlpD da hidrolase da mureína de *E. coli*. Esta família inclui também proteínas derivadas da quimiotaxina 2 (LECT2) e proteínas de leucócitos (ICHIKAWA et al., 1994; LANGE; HENGGE-ARONIS, 1994; OKUMURA et al., 2013). As endopeptidases B-líticas são metalopeptidases bacterianas que pertencem à família protease de M23. A clivagem é específica para

limites de glicina, especialmente em sequências de Gli-Gli-Xaa, em que Xaa é qualquer resíduo hidrofóbico alifático. Baseado na similaridade com D-Ala-D-Ala carboxipeptidase, tem sido sugerido um motivo conservado His-X-His (onde X é qualquer aminoácido) que faz parte do sítio de ligação.

Em um estudo, Ichimura e colaboradores (2002) desvendaram que YibP é uma proteína de 427 aminoácidos (47,4 kDa) de *E. coli*, a qual tem um peptídeo sinal no seu N-terminal que inicia-se no periplasma e atravessa a membrana interna, duas longas regiões espiraladas na parte central (presumida para formar um homodímero), e um domínio globular C-terminal, localizado no citoplasma, que envolve sequências de aminoácidos homólogas a peptidase M23/família M37. As proteínas que contêm domínios M37 são encontradas em bactérias gram positivas e negativas. Os 42 resíduos de aminoácidos no N-terminal de YibP, são consideravelmente hidrofílicos. Já os 99 resíduos no C-terminal apresentam uma elevada homologia com as regiões C-terminais da proteína NlpD de *E. coli* e proteínas hipotéticas YebA e YgeR. Tal como descrito para NlpD (LANGE; HENGGE-ARONIS, 1994), esta região tem uma homologia com lisostafina, uma peptidase extracelular que degrada o peptidoglicano de *Staphylococcus*, e pode ter uma função hidrolítica na formação e/ou manutenção da parede celular (HARA et al., 2002).

Estas informações são semelhantes às predições feitas para a ORF XAC0024 de Xac 306. Além de ter sido demonstrado que ela abrange um domínio peptidase M23 em sua região C-terminal, pesquisas realizadas com o programa SignalP 4.1 Server (PETERSEN et al., 2011) revelaram que esta ORF de 411 aminoácidos (quantidade próxima da YibP = 427 aminoácidos) contém no seu N-terminal um peptídeo sinal composto por 20 aminoácidos (aminoácidos 1 ao 20). Todos esses dados nos levam a crer que a ORF XAC0024 pode ter uma estrutura e localização subcelular análoga à YibP de *E. coli*. Esta hipótese não estaria de todo errada, uma vez que no estudo de Laia (2007), a ORF XAC0024 já foi predita para estar localizada no envelope celular. Quanto à sua função, tudo indica estar relacionada principalmente com o processo natural de divisão da bactéria, visto que o domínio peptidase M23 em bactérias é indicado em muitos trabalhos como relacionada à hidrólise do peptidoglicano da célula no momento da divisão celular. Outrossim,

análises em bancos de dados também demonstraram homologia do domínio peptidase M23 para com a região C-terminal de NlpD de *E. coli*, uma lipoproteína ativadora da hidrolase da mureína AmiC, com um motivo lisina (LysM), um pequeno domínio envolvido na ligação do peptidoglicano e fornecedor de um sinal de reconhecimento planta-patógeno, específicas na patogênese bacteriana (HARA et al., 2002).

YibP purificada tem uma atividade de protease que quebra o substrato β -caseína. A mutação nesta proteína inibiu a divisão celular e a formação do anel FtsZ a 42°C, sem a indução de SOS, levando à formação de células filamentosas com múltiplos nucleoides e, finalmente, à lise celular. Este fenômeno foi atribuído como sendo um efeito pleiotrópico para a célula, decorrente do mau funcionamento de YibP (ICHIMURA et al., 2002; BERNHARDT; DE BOER, 2004).

Esse conjunto de eventos pode ter ocorrido dentro da célula do mutante Δ XAC0024, visto que, no crescimento *in vivo*, ela não se desenvolveu no apoplasto foliar da mesma maneira que a Xac selvagem, houve um limite de multiplicação bacteriana até o 10 dai, com uma diferença de dez mil vezes a menos em quantidade de células, sendo que depois elas começaram a morrer enquanto a Xac 306 continuava a se multiplicar.

Por outro lado, a ORF XAC0024 inclui também o domínio EnvC. A proteína EnvC contém 3 domínios: um peptídeo sinal, um domínio espiralado e um domínio LytM (HARA et al., 2002; ICHIMURA et al., 2002; BERNHARDT; DE BOER, 2004). Esta informação é interessante em razão de que coincide com a investigação narrada por Ichimura e colaboradores (2002) e outros autores. Foi predito computacionalmente pelo NCBI que este multidomínio abrange a ORF XAC0024 por completa, sinalizando que o domínio pode estar relacionado com a função da ORF.

O multidomínio EnvC é responsável pela formação de septo da célula e ativação das hidrolases de mureína AmiA e AmiB no momento da divisão celular (controle do ciclo celular) (MARCHLER-BAUER et al., 2015) e o multidomínio PRK11637, também presente na ORF XAC0024, é um possível ativador de AmiB (NCBI, 2015). A divisão celular na maioria das bactérias, gram-positivas e gram-negativas, se dá pela formação de septos seguida por separação das células filhas. Esta ação, também chamada de citocinese, depende da clivagem do septo do

peptideoglicano que é sintetizado durante a divisão da célula. Em *E. coli*, envolve a invaginação coordenada das três camadas do envelope celular e o processo requer as atividades de pelo menos dez proteínas essenciais para a divisão, que são de origem citoplasmáticas (FtsA e FtsZ) ou de membrana interna (FtsB, FtsI, FtsK, FtsL, FtsN, FtsQ, FtsW e ZipA). Este processo foi também postulado para ser realizado pela ação das hidrolases da mureína (BERNHARDT; DE BOER, 2004).

Em um estudo, Heidrich e colaboradores (2001) relataram três hidrolases; amidases *AmiA*, *B* e *C* existentes em *E. coli* codificadoras para enzimas amidases N-acetilmuramyl-L-alanina. Elas estariam envolvidas, juntamente com as transglicosilases líticas, na divisão do septo do peptideoglicano durante a divisão celular. Adicionalmente a isso, as amidases foram apontadas para atuar como potentes enzimas autolíticas na presença de antibióticos. Mutantes por deleção nestas amidases se multiplicaram em longas cadeias de células não separadas e exibiram uma resposta tolerante à combinação normalmente lítica de aztreonam e bulgecin. Anéis espessos de mureína nos mutantes em *AmiA*, *AmiB* e *AmiC* se formaram no local de septos bloqueados, decorrente de ligações cruzadas triméricas e tetraméricas e, *in vitro*, estas estruturas foram digeridas mais lentamente por muramidases do que pela mureína circundante.

Em um mutante EnvC da *E. coli* estirpe PM61 constatou-se a formação de células filhas com cadeias de comprimentos longos, irregulares, com uma membrana exterior "mal vedada" ocasionando defeito na permeabilidade da mesma e termossensibilidade em baixa osmolaridade (HARA et al., 2002). Por fim, Park e Uehara (2008) mencionaram que existem três classes de enzimas que cortam as ligações de peptideoglicano: a classe 1 inclui as endopeptidases, a classe 2 as amidases e a classe 3 as transglicosilases. As amidases *AmiA*, *AmiB*, e *AmiC* estão situadas no periplasma e participam do processo de separação das células. Apenas um sexto da formação do septo do peptideoglicano é clivado pelas amidases, sendo o restante clivado pelas transglicosilases líticas. Entretanto, sem as amidases, a maioria das células permaneceriam fixadas umas às outras nas cadeias, indicando que a separação não seria completamente impedida, porém seria retardada.

Essas informações confirmam mais uma vez os resultados do teste de patogenicidade e crescimento bacteriano *in vivo* do presente estudo, e sugere que a deleção na ORF XAC0024 pode ter afetado as amidases que são ativadas pelo domínio EnvC, juntamente com toda maquinaria metabólica de septação e divisão celular, fazendo com que o desenvolvimento de sintomas retardado por parte do mutante Δ XAC0024 em folhas de limão cravo, apresentasse um fenótipo menos agressivo quando comparado com Xac 306. Provavelmente o mutante teve dificuldades em se dividir corretamente e, assim, com muitas células unidas em forma de correntes, a maioria não conseguiu enfrentar e contornar os mecanismos de defesa da planta, limitando sua sobrevivência no apoplasto foliar. A marcação da proteína XAC0024 com uma proteína sinalizadora como a GFP poderia revelar o seu local de ação na célula de Xac.

Por outro lado, embora importante para a divisão celular, as amidases não são essenciais para o crescimento celular. Sob condições de testes laboratoriais, todos os mutantes *AmiA*, *B* e *C* de *E. coli* apresentaram taxas de crescimento e rendimento quase inalteradas (HEIDRICH et al., 2001; AKERLUND et al., 1992; DONACHIE BEGG, 1996). Neste ponto, este dado vem de encontro com o resultado obtido no crescimento bacteriano *in vitro* do mutante Δ XAC0024. Parece possível sustentar que as células do mutante Δ XAC0024, em meio de cultura líquido NB, estariam se multiplicando na mesma proporção que a Xac selvagem, uma vez que, além de ser um meio rico em nutrientes, não oferece as barreiras de defesa da planta como limitação ao crescimento bacteriano, porém, esta multiplicação estaria ocorrendo de forma desordenada, incompleta, defeituosa e como a própria literatura descreve, células unidas em forma de cadeias. Este crescimento anormal em cadeias também é consistente com o ensaio de agregação célula a célula, no qual as células do mutante Δ XAC0024 não conseguiram se agrupar umas as outras em meio de cultura líquido NB, como se tivessem perdido a capacidade de emitir sinais umas as outras, permanecendo dispersas no meio por um período mais longo do que a Xac 306. Entretanto, uma análise microscópica do formato das células do mutante em meio de cultura não foi realizada para confirmar esta hipótese.

Ao analisar o multidomínio SMC_prok_B (B-protein_prokaryotes_Structural Maintenance of Chromosomes), contido na ORF XAC0024, foi descoberto que está

relacionado com uma proteína de segregação cromossômica. As proteínas SMC ligam-se ao DNA e atuam na manutenção estrutural, organização e segregação dos cromossomos para a partição. São encontradas em Archaea, Bacteria e Eukarya. Esta família de proteínas representa as SMCs da maioria das bactérias. O gene *smc* está frequentemente associado com os genes *scpB* e *scpA*, onde *scp* significa segregação e condensação da proteína. SMC foi mostrada em *Caulobacter crescentus* para ser induzida no início da fase S, mas presente e ligada ao DNA ao longo do ciclo celular (SOPPA et al., 2002; JENSEN; SHAPIRO, 1999). Proteínas SMC foram também demonstradas que são essenciais na segregação dos cromossomos de *Bacillus subtilis* (BRITTON et al., 1998; MORIYA et al., 1998) e de *E. coli* (NIKI et al., 1991). Em *E. coli*, nomeia-se de MukB, o homólogo à SMC.

Estas proteínas foram descobertas, há vários anos, em levedura e agora são conhecidas por estarem em muitos procariontes e em todos os eucariontes. Proteínas SMC possuem mais do que mil aminoácidos e, semelhantemente como já descrito para a proteína YibP (ICHIMURA et al., 2002) e EnvC (HEIDRICH et al., 2001), SMC compreende cinco domínios estruturais: (i) um domínio globular no N-terminal, incluindo um motivo de ligação à nucleotídeos em forma de gancho-P; (ii) um primeiro domínio espiralado de 200 a 400 aminoácidos; (iii) um domínio dobrado de comprimento variável formando dois monómeros que dimerizam em forma antiparalela, gerando, assim, um complexo simétrico de dois braços; (iv) um segundo domínio espiralado de 200 a 400 aminoácidos; e (v) um domínio globular C-terminal, que contém um motivo ativo conservado (SOPPA et al., 2002; HAERING et al., 2002). Os domínios N- e C- terminais associados, formam um domínio de ligação à ATPase e ao DNA (JENSEN; SHAPIRO, 2003). Domínios espiralados geralmente medeiam interações proteína-proteína, e dimerização de proteínas SMC tem de fato sido observado. Alguns trabalhos recentes e outros mais antigos resumem o conhecimento atual sobre a estrutura da proteína SMC, função e distribuição (LI et al., 2010; EEFTENS et al., 2016; HIRANO, 2016; HOLMES; COZZARELLI, 2000; GRAUMANN, 2001; SOPPA, 2001).

O padrão de localização de SMC em *Caulobacter* foi observado por microscopia de imunofluorescência de células fixadas e fusões SMC-YFP ou GFP-SMC em células vivas, na qual demonstrou que muitas células no período pré-

divisional do ciclo celular têm focos luminosos de proteínas SMC no polo da célula, que são perdidos após a divisão celular (JENSEN; SHAPIRO, 2003). As proteínas SMC de eucariotos formam complexos com várias subunidades que não fazem parte de SMC, mas que afetam sua função, sendo, portanto, considerados heterodímeros; ao passo que os homólogos em procariotos não tem estes “parceiros” e foram, por conseguinte, deduzidos que agem como simples homodímeros. Estas proteínas revelaram-se de sobremaneira em forma de espirais enroladas intramoleculares (HAERING et al., 2002).

Segundo Soppa e colaboradores (2002), os genes *scpA* estão posicionados próximos de genes *smc* em quase todas as Archaea que contém SMC, propondo que eles pertencem ao mesmo operon e estão, portanto, envolvidos num processo comum na célula. Eles evidenciaram que os mutantes de *scpA* apresentam fenótipos específicos quase idênticos aos mutantes de *smc* como produção de células anucleadas, crescimento sensível à altas temperaturas, formação de nucleoides com aberração e divisão violenta dos cromossomos através de um evento chamado “efeito de guilhotina”. Interessantemente, os mutantes de outro gene de *B. subtilis*, *scpB*, que está localizado à jusante de *scpA*, exibe os mesmos fenótipos, o que indica que *scpB* também está envolvido nessas funções. A proteína ScpB está geralmente presente nas espécies que também codificam ScpA. Em conclusão, estes eventos enunciam que as três proteínas, SMC, ScpA e ScpB atuam juntas num complexo para a segregação cromossômica em todos os procariontes que as contêm.

Apenas à título de conhecimento, o pequeno domínio predito na ORF XAC0024, Apg6 (albino ou “pale-green”) da proteína 6, está envolvido no processo de autofagia (KAMETAKA et al., 1998), o qual constitui-se em degradação de massa induzida pela morte de células eucarióticas (SUZUKI et al., 2001). Já para Myouga e colaboradores (2006) este domínio codifica uma chaperona molecular envolvida na diferenciação do plastídeo e na termotolerância de cloroplastos durante o estresse térmico (MYOUGA et al., 2006). Como se pode notar, essas definições fazem referência às células eucarióticas, não tendo sentido para explicar os mecanismos de atuação de uma bactéria. Entretanto, como Apg6 aparece na ORF em um tamanho de comprimento bem pequeno, é porque algumas poucas sequências de

aminoácidos desta proteína eucariótica são conservados e pode ser, portanto, que Apg6 em Xac 306 tenha um atributo correlacionado de função análoga às proteínas autofagocitárias de eucariotos.

Correlacionando com as informações dos outros domínios citados acima, uma dessas funções seria a de autólise (bacteriolise) por interferir especificamente com a interação íntima das enzimas na maquinaria de síntese de mureína, ou, a degradação do peptidoglicano no momento da divisão celular. Porém, nenhum desses efeitos pressupostos serão considerados como prejudicado no mutante, uma vez que a mutação não atingiu esse domínio. A deleção ocorreu a partir do aminoácido 124 até o 321, isto é, todos os aminoácidos localizados entre esses dois e, incluindo esses dois, foram deletados. Como o domínio Apg6, predito nesta ORF, está posicionado antes do aminoácido 124, não foi afetado. Todos os outros domínios tiveram a metade ou mais da metade deletada e o domínio peptidase M23 saiu de "frame". Entretanto, o mais provável é que a proteína XAC0024 truncada não seja produzida, pois o mRNA, se produzido, seria degradado pelo sistema de reconhecimento da bactéria. Quanto ao domínio DUF1003, não está esclarecido sua função, impossibilitando assim a obtenção de informações relevantes e que elucidem sua possível função (NCBI, 2015).

Paralelamente aos domínios da ORF XAC0024, os biofilmes são populações bacterianas incluídas em uma matriz e que se aderem umas às outras, nas superfícies ou nas interfaces. Tem o propósito de proteção contra agentes bióticos e abióticos. Um aspecto fundamental da formação do biofilme é a produção da matriz extracelular. Nas bactérias como *Pseudomonas*, acredita-se que esta matriz seja composta de exopolissacarídeo (EPS), DNA e proteínas (KLAUSEN et al., 2006). Na interação planta-patógeno a formação de biofilme está relacionada com a virulência de diversas bactérias patogênicas (DANHORN; FUQUA, 2007).

Em Xac, a habilidade de formar e se desligar do biofilme tem ponderáveis efeitos para a sobrevivência na superfície foliar hospedeira, o que já comprovou ser importante para o ciclo da doença. Entretanto, a formação de biofilme de patógenos de planta, principalmente daqueles que atacam tecidos do mesófilo ainda é pouco estudada (MARQUES et al., 2002; DOW et al., 2003; CROSSMAN; DOW, 2004; RIGANO et al., 2007).

Sabe-se que as bactérias utilizam uma variedade de mecanismos de motilidade para colonizar ambientes, como “natação” por flagelos, contrações, deslocamento através do vento e deslizamento suave (HARSHEY, 2003). Em um estudo funcional, Gottig et al. (2010) sugeriram que a *Xac* pode fixar-se à superfície do hospedeiro através de adesinas, como a proteína hemaglutinina filamentosa *FhaB* (GOTTIG et al., 2009); uma vez que, ao realizar uma mutação no gene *XacFhaB*, o mesmo causou lesões de cancro mais dispersas e mostrou um comprometimento de adesão, anexação na superfície da folha e na formação de biofilme. Isso indica que, após sua fixação, a bactéria selvagem injeta efetores de patogenicidade no hospedeiro através do sistema de secreção tipo III e a partir daí, a fim de prolongar a sua sobrevivência e colonização, a bactéria produz biofilmes, através da produção de exopolissacarídeos (EPS), goma xantana e *FhaB* (HUANG; LU; CHEN, 2013).

O mutante de deleção na ORF XAC0024 teve a sua virulência afetada. Entretanto, ao contrário do mutante para o gene *XacFhaB*, a infecção pelo Δ XAC0024 exibiu lesões pouco dispersas e em menor número, que se restringiu apenas ao local da infiltração do inóculo, indicando dificuldade do mutante em se desenvolver no lóbulo foliar por completo em que foi aplicado a suspensão bacteriana, diferente do que ocorre com a *Xac* 306 selvagem. Este resultado sugere que em *Xac*, a deleção feita na ORF XAC0024 poderia estar causando redução da capacidade de migração, desenvolvimento e/ou interação das bactérias mutantes, restringindo a sua permanência ao local em que foi aplicado o inóculo, diminuindo assim, a capacidade de causar virulência na mesma proporção que a *Xac* 306 selvagem. O esgotamento da fonte de alimento pode levar à morte das bactérias.

Diversos autores têm proposto que a xantana possui relação com a motilidade “sliding”, visto que mutantes do operon gum que não produziram goma xantana apresentaram redução na motilidade. O resultado do atual trabalho demonstrou que o mutante Δ XAC0024 possui maior produção de EPS *in vitro*. Se esta maior produção também ocorre *in vivo* ainda precisa ser investigado. Todavia, a maior quantidade de xantana *in vitro* pode ser explicada por um mecanismo de compensação pela má estruturação das células, em forma de cadeias unidas, e pela diminuição na interação célula-a-célula. A bactéria estaria produzindo mais goma

como uma forma de contornar sua deficiência e facilitar sua motilidade. Esse pressuposto foi sugerido por Gottig e colaboradores (2009), ao estudarem mutantes com deficiência para a enzima *XacFhaB*. Quanto maior a quantidade de EPS, maior deverá ser a movimentação da bactéria (MURRAY; KAZMIERCZAK, 2008).

Por outro lado, observamos que o mutante Δ XAC0024 que produz mais xantana *in vitro*, não alterou significativamente a formação de biofilme. Duas hipóteses podem ser sugeridas: na primeira, o EPS goma pode não ser o único responsável pela formação de biofilme e que as adesinas de *Xac* também são essenciais para este processo; na segunda, o experimento realizado neste trabalho, em um tempo de 48 horas, não forneceu o tempo necessário para que o mutante Δ XAC0024 formasse biofilme em quantidade estatisticamente diferente de *Xac* selvagem na superfície abiótica. Acredita-se que um prazo de 96 horas seria o tempo ideal para avaliar a produção de biofilme nos dois isolados, quando então diferença significativa poderia ter acontecido. Esta segunda hipótese está baseada no fato de que o biofilme é composto por EPS (como a goma) DNA e proteínas. Se o mutante Δ XAC0024 produziu mais goma que a *Xac* selvagem, conseqüentemente, esperar-se-ia que produzisse mais biofilme também. Em *Xac* os exopolissacarídeos produzidos constituem a maior parte da estrutura do biofilme maduro (COSTERTON et al., 1995; LI; WANG, 2011b; RIGANO et al., 2007).

A goma xantana é o principal EPS produzido pelo gênero *Xanthomonas* e desempenha um importante papel na sua sobrevivência, protegendo-a contra a luz UV, congelamento e dessecação (MEYER; BOGDANOVE, 2009) e, também, atua na formação dos sintomas, uma vez que com a multiplicação da bactéria no mesófilo juntamente com a goma, ocorre perda do espaço intercelular, impulsionando a planta a aumentar a captação de água pelos capilares, produzindo assim, o fenômeno de “water soaking” ou encharcamento como sintoma característico da infecção por *Xac* (PADMANABHAM; VIDHYASEKARAN; RAJAGOPALAN, 1974). A habilidade de produzir exopolissacarídeos também tem sido correlacionada com a virulência de várias outras bactérias fitopatogênicas, principalmente de *Xanthomonas* spp. (DHARMAPURI; SONTI, 1999; KATZEN et al., 1999), como por exemplo, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. citri* subsp. *citri* (BÜTTNER; BONAS, 2010). Os mutantes com deficiência na produção de xantana

de várias *Xanthomonas* mostram virulência reduzida em comparação com bactérias selvagens (DUNGER et al., 2014; RIGANO et al., 2007).

Os passos iniciais da síntese de EPS não são ainda bem esclarecidos, mas sabe-se que proteínas de membrana estão envolvidas nesse processo (BIANCO et al., 2014). Por exemplo, a proteína que comanda a biossíntese das unidades pentaméricas repetidas do polissacarídeo xantana, GumB, é uma proteína de membrana (GALVÁN et al., 2013) e faz parte do operon composto por 12 genes (*gumB-M*) (KATZEN et al., 1998). Correlacionando essas informações com a ORF XAC0024, sendo esta uma proteína possivelmente aderida à membrana interna, poderia ela, além da função sugerida na divisão celular, estar envolvida também na produção de goma xantana, como um fator na produção de virulência. Foi sugerido que a mutação na proteína YibP, homóloga à ORF XAC0024, e ancorada à membrana interna de *E. coli*, inibiu a divisão celular e a formação do anel FtsZ a 42°C, sem a indução de SOS, levando à formação de células filamentosas com múltiplos nucleoides (unidas em cadeia) e, finalmente, à lise celular (ICHIMURA et al., 2002; BERNHARDT; DE BOER, 2004). Esta informação, se tomada para a ORF XAC0024 juntamente com a sua dificuldade em formar agregados, corrobora com a maior produção de exopolissacarídeo goma pelo Δ XAC0024.

Ora, se a divisão celular está prejudicada, é óbvio que a bactéria não conseguirá se manter por muito tempo no apoplasto foliar, aberrações na estrutura celular impede o bom funcionamento da mesma e o desvio das moléculas pré-formadas de defesa da planta. Esse estresse sofrido pela sua própria estrutura, em conjunto com o ambiente, levaria o mutante Δ XAC0024 a se multiplicar por apenas algumas gerações até sofrer lise celular, impossibilitando desta forma, a formação de sintomas de cancro na mesma proporção que a Xac 306. Porém, especula-se que este argumento não deve ser o único a justificar a diminuição da multiplicação e quantidade de bactérias no apoplasto foliar, exposto na curva *in vivo* deste trabalho. Há evidências de que ela tem parte no processo das vias de regulação da virulência de Xac. A expressão da proteína da ORF XAC0024 poderia estar sendo regulada pelo sistema de secreção tipo II, que também coordena a expressão de genes de virulência, e a maior quantidade de EPS observado no mutante Δ XAC0024 pode ser atribuído à adaptação desta via de regulação (GOTTIG et al., 2009).

Já foi relatado que, em bactérias Gram negativas, o domínio peptidase M23 é necessário para a divisão celular mas, em alguns casos, para o desenvolvimento de virulência também. Temos algumas proteínas como exemplo. A proteína LasA é uma metalopeptidase M23 de *Pseudomonas aeruginosa* conhecida por estar envolvida na entrada do patógeno em células hospedeiras e implicada na degradação da elastina (PARK et al., 2000; PARK et al., 2001). NlpD, uma lipoproteína de *Yersinia pestis* da família peptidase M23 foi demonstrada ser essencial para o desenvolvimento da virulência da peste bubônica e pneumônica (TIDHAR et al., 2009). NMB0315, Vly e LytM são peptidases do tipo lisostafina da família metalopeptidases M23 dependentes de zinco, sendo NMB0315 de *Neisseria meningitidis* sorogrupo B (NMB), Vly de *Vibrio cholerae* e LytM de *Staphylococcus aureus* (WANG et al., 2011; RAGUMANI et al., 2008; RAMADURAI; JAYASWAL, 1997).

Proteínas desta família são caracterizadas por um sítio ativo conservado contendo um motivo HxH, que faz parte do sítio de ligação (onde X é qualquer aminoácido e H é uma histidina) e todas são dependentes de zinco (HOOPER, 1994; BOCHTLER et al., 2004). Um mapa de densidade eletrônica foi desenhado para a proteína NMB0315, demonstrando um íon metálico ligado no domínio III. Três resíduos espacialmente adjacentes (His-Asp-His) e duas moléculas de água coordenam esse íon metálico. Duas outras histidinas também participam de interações com o íon metálico através da molécula de água. Foi constatado que esta organização do local ativo é altamente conservada em membros da família M23 (WANG et al., 2011).

Os três domínios protéicos individuais de LasA, NlpD, NMB0315, Vly e LytM são muito similares entre si (e descritos da mesma forma para Yipb, EnvC e SMC_prok_B), porém, o arranjo espacial global dos três domínios são distintos. NMB0315, Vly e LytM foram relatadas para estarem em um estado conformacional inativo. As três proteínas partilham a característica conformacional de usar um segmento do N-terminal para bloquear o sítio ativo da enzima. Esta evidência sugere que as lisostafinas são sintetizadas como uma pró-enzima e necessitam de mais processamento para se tornarem ativas. Em contraste, o sulco local ativo da proteína LasA está bem aberto e pronto para a entrada do substrato. Com base na

comparação de NMB0315 com de outras metalopeptidases M23 na sua forma ativa, foi proposto que a maturação de NMB0315 requer que o domínio amino-terminal seja removido. Estas observações sugerem que a ORF XAC0024, a qual possui os mesmos domínios protéicos individuais, pode ter um arranjo estrutural similar à descrita para NMB0315 e que o seu sítio ativo também pode se apresentar naturalmente inibido até o momento em que vias metabólicas responsáveis pela divisão celular e/ou virulência bacteriana o ative para exercer sua função (WANG et al., 2011).

Como mencionado no item 2.4, outras duas ORFs hipotéticas conservadas com o mesmo domínio peptidase M23 foi encontrado no genoma de Xac 306, sendo elas a ORF XAC3898 e a ORF XAC3368. Laia (2007) descreveu que a ORF XAC3898 está relacionada com o endereçamento de proteína e a ORF XAC3368 como sendo uma proteína de ligação e transporte. Uma pesquisa no “National Center for Biotechnology Information” mostrou que, diferentemente da ORF XAC0024, a ORF XAC3898 apresenta um pequeno domínio OapA, descrito como uma proteína A associada a opacidade (“Opacity-associated protein A”) incluída em outro domínio, o LysM (motivo envolvido na ligação do peptidoglicano e fornecedor de um sinal de reconhecimento planta-patógeno, específicas na patogênese bacteriana). OapA é necessária para a eficiente colonização da mucosa da nasofaringe por *Haemophilus influenzae*, a sua expressão está associada a um fenótipo distintivo de colônia transparente e é predita para ser segregada. Por outro lado, a ORF XAC3368 apresenta, diferentemente das outras duas ORFs, um pequeno domínio FliL, predito como uma proteína associada ao corpo basal flagelar. Segundo Jenal, White e Shapiro (1994) a rotação flagelar requer a proteína FliL, visto que, eliminações no “frame” do gene fliL resultaram em células com um flagelo sem rotação.

As informações coletadas dessas duas ORFs teve como objetivo dar um suporte aos resultados obtidos com a ORF XAC0024. Pode-se constatar que, apesar delas terem outros domínios e tamanhos diferentes, esses fornecem evidências de relação com a patogenicidade da bactéria, e se as três ORFs compartilham entre si o domínio peptidase M23, significa que provavelmente elas podem atuar em conjunto em alguma via de patogenicidade e/ou virulência da

bactéria. Se assim for, uma mutação em alguma delas, poderia afetar ou não o bom funcionamento das outras, sobrecarregando as suas funções ou mudando a maneira de cada uma se comportar.

Quanto ao fato da proteína codificada pela ORF XAC0024 estar amplamente distribuída em espécies bacterianas de vários filos, ela pode ser considerada uma proteína ortóloga e extremamente conservada, não sendo específica de *Xac*. Além disso, por ser extremamente conservada no Domínio Bacteria, pode-se concluir que essa proteína tenha uma função ancestral. A função da XAC0024 pode estar envolvida, por exemplo, com mecanismos de divisão celular, de defesa ao estresse ambiental, de obtenção de nutrientes, entre outros relacionados ao metabolismo basal bacteriano. Isso justifica ainda mais a necessidade de se conhecer a sua função específica em XAC.

De acordo com as investigações reunidas até aqui, fica difícil atribuir uma função específica para a ORF XAC0024. Contudo, com os resultados do atual estudo foi possível desvendar a importância da ORF XAC0024 no desenvolvimento da virulência de XAC e as análises de literatura forneceram uma boa compreensão dos domínios preditos à esta ORF. Foi demonstrado que Peptidase M23, EnvC e SMC_prok_B estão correlacionados entre si em estrutura e função, aumentando a veracidade das predições estabelecidas pelos programas de bioinformática. Porém, experimentos mais específicos, como a caracterização funcional da proteína, avaliação de sua real forma tridimensional e análise em microscopia óptica do mutante Δ XAC0024 necessitam ser realizados para confirmação das hipóteses levantadas neste trabalho. Outros estudos com outras peptidases desta família também são esperados para fornecer uma compreensão mais completa da inibição, ativação e mecanismo hidrolítico das metalopeptidases M23.

Essa é uma primeira evidência de que a mutação da ORF XAC0024 interfere na virulência, afeta a produção de goma xantana e a agregação celular de *Xac* 306. A hipótese é de que a proteína codificada pela ORF XAC0024 participe do sistema de degradação do peptidoglicano na divisão celular em *Xac*, sendo que experimentos adicionais são necessários para confirmar ou não esta hipótese.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados encontrados neste trabalho, podemos concluir que:

- Através de mutação sítio-dirigida, obteve-se o mutante de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, na ORF XAC0024 (Δ XAC0024), que codifica para uma proteína hipotética contendo domínios Peptidase_M23, EnvC, PRK11637, SMC_prok_B, DUF1003 e APG6;
- O mutante Δ XAC0024 apresenta redução dos sintomas de cancro cítrico, demonstrado pela diminuição do encharcamento, hiperplasia, hipertrofia e necrose;
- Os ensaios experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o mutante Δ XAC0024 tem dificuldades em se desenvolver no apoplasto foliar, porém, não em meio nutritivo, indicando que a proteína XAC0024 não é necessária para a multiplicação da célula *in vitro* mas é necessária para a multiplicação *in planta*;
- O mutante Δ XAC0024 apresentou maior formação de goma xantana, diminuição na capacidade de formar agregados entre suas células e inalterabilidade na formação de biofilme comparado à Xac 306;
- A ORF XAC0024 pode estar relacionada com a virulência da Xac, uma vez que o domínio peptidase M23 já foi apresentado em outras bactérias como tendo cooperação nesse processo. Contudo, outros estudos precisam ser realizados para poder fornecer uma compreensão mais completa e exata da atuação desta ORF nos mecanismos de virulência da Xac.

8 REFERÊNCIAS

AH-YOU, N.; GAGNEVIN, L.; GRIMONT, P. A. D.; BRISSE, S.; NESME, X.; CHIROLEU, F.; BUI THI NGOC, L.; JOUEN, E.; LEFEUVRE, P.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to members of the Anacardiaceae and their relatedness to species of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, n. 2, p. 306-318, 2009.

AKERLUND, T.; BERNANDER, R.; NORDSTRÖM, K. Cell division in *Escherichia coli* minB mutants. **Molecular Microbiology**, Uppsala, v. 6, n. 15, p. 2073-2083, 1992.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALTSCHUL, S. F.; WOOTTON, J. C.; GERTZ, E. M.; AGARWALA, R.; MORGULIS, A.; SCHÄFFER, A. A.; YU, Y-K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. Mini Review **The FEBS Journal**, Bethesda, v. 272, p. 5101-5109, 2005.

ALVES, P. R. B.; MELO, B. Cultura dos Citros. In: **Núcleo de estudo em fruticultura no cerrado**. Universidade Federal de Uberlândia. 2003. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm>>. Acesso em: 25/10/2013.

ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Studies on a viscous, gel-forming expolysaccharide from *Sphingonomas paucimobilis* GS1. **Applied and environmental microbiology**, Baroda, v. 61, n. 3, p. 1159-1162, 1995.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2^a ed. London, Elsevier Academic Press, 2004.

BERGAMIN-FILHO, A.; HUGHES, G. Citrus canker epidemiology - methodologies and approaches. **Proc. Intn. Citrus canker Res. Workshop**, Day 2, June 21 2000, Ft. Pierce, Florida. Disponível em: <<http://www.freshfromflorida.com/content/download/9986/136184/iccrw-transcript06-21-00.pdf>>. Acesso em: jan. 2014

BERNHARDT, T. G.; DE BOER, P. A. J. Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. **Molecular Microbiol**, Cleveland, v. 52, n. 5, p. 1255-1269, 2004.

BIANCO, M. I.; JACOBS, M.; SALINAS, S. R.; SALVAY, A. G.; LELMINI, M. V.; LELPI, L. Biophysical characterization of the outer membrane polysaccharide export protein and the polysaccharide co-polymerase protein from *Xanthomonas campestris*. **Protein Expression and Purification**, v. 101, p. 42-53, 2014.

BLOMFIELD, I. C.; VAUGHN, V.; REST, R. F.; EISENSTEIN, B. I. Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* sacB gene and a temperature-sensitive pSCI01 replicon. **Molecular Microbiology**, Michigan, v. 5, n. 6, p. 1447-1457, 1991.

BOCHTLER, M.; ODINTSOV, S. G.; MARCYJANIAK, M.; SABALA, I. Similar active sites in lysostaphins and D-Ala-D-Ala metallopeptidases. **Protein/Science**, Dresden, v. 13, p. 854-861, 2004.

BRADBURY, J. F. Genus II *Xanthomonas*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams & Wilkins, 1984, v. 1, p. 199-210.

BRITTON, R. A.; GROSSMAN, A. D. Synthetic lethal phenotype caused by mutations affecting chromosome partitioning in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Cambridge, v. 181, n. 18, p. 5860-5864, 1999.

BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular plant pathology**, Florida, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiol Reviews**, Halle-Wittenberg, n. 34, p. 107-133, 2010.

CAI, Y. P.; WOLK, C. P. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. Strain PCC7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. **Journal of Bacteriology**, Michigan, v. 172, n. 6, p. 3138-3145, 1990.

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J. S.; YAMAMOTO P. T. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 55-59, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2001000100009>>.

CITRUS BR – Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. Comércio - Exportações Brasileiras. Disponível em <<http://www.citrusbr.com/>>. Acesso em: 02 mar. 2016.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira. Laranja, safra 2013/2014. Terceiro Levantamento - São Paulo e Triângulo Mineiro**. Brasília, DF, p. 1-11, dez. 2013.

COSTERTON, J. W. LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H-M. Microbial biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, v. 49, p. 711-45, 1995.

CROSSMAN, L.; DOW, J. M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Review Microbes and Infection**, Cork, v. 6, p. 623-629, 2004.

DA SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYYS, 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/417459a>>.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. **The Annual Review of Microbiology**, Bloomington, v. 61, p. 401-22, 2007.

DAS, A. K. Citrus Canker. A review. **J. Appl. Hort.**, v. 5, n. 1, p. 52-60, 2003.

DHARMAPURI, S.; SONTI, R. V. A transposon insertion in the gumG homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 1, p. 53-59, 1999.

DINIZ, D. M.; DRUZIAN, J. I.; AUDIBERT, S. Produção de goma xantana por cepas nativas de *Xanthomonas campestris* a partir de casca de cacau ou soro de leite. **Polímeros**, Salvador, v. 22, n. 3, p. 278-281, 2012.

DOCENA, C. **Identificação das interações envolvendo proteínas relacionadas aos Sistemas de Dois-Componentes e aos Sistemas Secretórios do Tipo III e IV do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2006. 181 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

DONACHIE, W. D.; BEGG, K. J. "Division potential" in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Edinburgh, v. 178, n. 20, p. 5971-5976, 1996.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p.1-18.

DOW, J. M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K.; HE, Y-Q.; FENG, J-X.; TANG, J-L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Guangxi, v. 100, n. 19, 2003.

DUNGER, G.; GUZZO, C. R.; ANDRADE, M. O.; JONES, J. B.; FARAH, C. S. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV Pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, p. 1132-1147, 2014.

EEFTENS, J. M.; KATAN, A. J.; KSCHONSAK, M.; HASSLER, M.; DE WILDE, L.; DIEF, E. M.; HAERING, C. H.; DEKKER, C. Condensin Smc2-Smc4 Dimers Are Flexible and Dynamic. **Cell Reports**, Heidelberg, v. 14, n. 1, p. 1813-1818, 2016.

FARIA, S. **Produção de goma xantana empregando caldo de cana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459**. 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005

FERREIRA, R. M. **Secretoma da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Secretaria da Agricultura de São Paulo muda lei de controle de cancro cítrico. In: **Comunicação**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias>>. Acesso em: 26/10/2013.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Secretaria da Agricultura de São Paulo muda lei de controle de cancro cítrico. In: **Comunicação**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias>>. Acesso em: 25/02/2016.

GALVÁN, E. M.; LELMINI, M. V.; PATEL, Y. N.; BIANCO, M. I.; FRANCESCHINI, E. A.; SCHNEIDER, J. C.; LELPI, L. Xanthan chain length is modulated by increasing the availability of the polysaccharide copolymerase protein GumC and the outer membrane polysaccharide export protein GumB. **Glycobiology**, Buenos Aires, v. 23, n. 2, p. 259-72, 2013.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. A Filamentous Hemagglutinin-Like Protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the Phytopathogen Responsible for Citrus Canker, Is Involved in Bacterial Virulence. **PLoS ONE**, Rosario, v. 4, n. 2, p. 1-12, 2009.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ZIMARO, T.; SGRO, G. G.; FICARRA, F. A.; DUNGER, G.; DAURELIO, L. D.; THOMAS, L.; GEHRING, C.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. In: MENDZ-VILAS, A. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Formatex Research Center: Badajoz, 2010. 196-204.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO J.; ACHOR DS: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol Plant Pathol**, Lake Alfred, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

GRAUMANN, P. L. SMC proteins in bacteria: Condensation motors for chromosome segregation? **Biochimie**, v. 83, n. 1, p. 53-59, 2001.

GUO, Y.; SAGARAM, U. S.; KIM, J-S.; WANG, N. Requirement of the galU gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth *in planta* of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Lake Alfred, v. 76, n. 7, p. 2234-2242, 2010.

HAERING, C. H.; LÖWE, J.; HOCHWAGEN, A.; NASMYTH, K. Molecular Architecture of SMC Proteins and the Yeast Cohesin Complex. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 9, p. 773-788, 2002.

HARA, H.; NARITA, S.; KARIBIAN, D.; PARK, J. T.; YAMAMOTO, Y.; NISHIMURA, Y. Identification and characterization of the *Escherichia coli* *envC* gene encoding a periplasmic coiled-coil protein with putative peptidase activity. **FEMS Microbiology Letters**, Hyogo, v. 212, p. 229-236, 2002.

HARSHEY, R. M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Reviews Microbiology**, Austin, v. 57, p. 249-273, 2003.

HEIDRICH, C.; TEMPLIN, M. F.; URSINUS, A.; MERDANOVIC, M.; Berger, J.; SCHWARZ, H.; DE PEDRO, M. A.; HÖLTJE, J-V. Involvement of *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiol**, Madrid, v. 41, n. 1, p. 167-178, 2001.

HIGUCHI, R.; KRUMMEL, B.; SAIKI, R. K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. **Nucleic Acids Research**, Berkeley, v. 16, n. 15, p. 7351-7367, 1988.

HIRANO, T. Condensin-Based Chromosome Organization from Bacteria to Vertebrates. **Leading Edge Review Cell**, Saitama, v. 164, 2016.

HOLMES, V. F.; COZZARELLI, N. R. Closing the ring: Links between SMC proteins and chromosome partitioning, condensation, and supercoiling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Berkeley, v. 97, n. 4, p. 1322-1324, 2000.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. **Minireview FEBS Letters**, v. 354, p. 1-6, 1994.

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**, New York, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062824>>.

HUGUET, E.; HAHN, K.; WENGELNIK, K.; BONAS, U. hpaA mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. **Molecular Microbiology**, Gif-sur-Yvette, v. 29, n. 6, p. 1379-1390, 1998.

ICHIKAWA, J. K.; LI, C.; FU, J.; CLARKE, S. A Gene at 59 Minutes on the *Escherichia coli* Chromosome Encodes a Lipoprotein with Unusual Amino Acid Repeat Sequences. **Journal of Bacteriology**, Los Angeles, v. 176, n. 6, p. 1630-1638, 1994.

ICHIMURA, T.; YAMAZOE, M.; MAEDA, M.; WADA, C.; HIRAGA, S. Proteolytic activity of YibP protein in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Kyoto, v. 184, n. 10, p. 2595-2602, 2002.

JENAL, U.; WHITE, J.; SHAPIRO, L. *Caulobacter* Flagellar Function, but not Assembly, Requires FliL, a Non-polarly Localized Membrane Protein Present in all Cell Types. **Journal of Molecular Biology**, v. 243, n. 2, p. 227-244, 1994.

JENSEN, R. B.; SHAPIRO, L. Cell-Cycle-Regulated Expression and Subcellular Localization of the *Caulobacter crescentus* SMC Chromosome Structural Protein. **Journal of Bacteriology**, Stanford, v. 185, n. 10, p. 3068-3075, 2003.

JHA, G.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Bacterial Type Two Secretion System Secreted Proteins: Double-Edged Swords for Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Hyderabad, v. 18, n. 9, p. 891-898, 2005.

JING, Z.; FENG, H. Studies on the Molecular Docking and Amino Acid Residues Involving in Recognition of Substrate in Proline Iminopeptidase by Site-Directed Mutagenesis. **The Protein Journal**, New York, v. 34, n. 3, p. 173-180, 2015.

KAMETAKA, S.; OKANO, T.; OHSUMI, M.; OHSUMI, Y. Apg14p and Apg6/Vps30p Form a Protein Complex Essential for Autophagy in the Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, Yamanashi, v. 273, n. 35, p. 22284-22291, 1998.

KANIGA, K.; DELOR, I.; CORNELIS, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. **Gene**, New York, v. 109, p. 137-141, 1991.

KAPP, J. F. **Faixa de hospedeiros de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (isolado FDC 1609) patogênica a citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*)**. 2011. 19 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Fundo de Defesa da Citricultura, Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citrus, Araraquara, 2011.

KATZEN, F.; FERREIRO, D. U.; ODDO, C. G.; LELMINI, M. V.; BECKER, A.; PÜHLER, A.; LELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: Effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1607-1617, 1998.

KLAUSEN, M.; GJERMENSEN, M.; KREFT, J.-U.; TOLKER-NIELSEN, T. Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. **Minireview FEMS Microbiology Letters**, Bonn, v. 261, p. 1-11, 2006.

KOLTER, R.; INUZUKA, M.; HELINSKI, D. R. Transcomplementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid RK6. **Cell**, San Diego, v. 15, n. 4, p. 1199-1208, 1978.

LAIA, M. L. **Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. implicados na patogênese**. 2007. 344 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.

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**, Jaboticabal, v. 9, n. 12, p. 1-17, 2009.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. **Molecular Microbiology**, Konstanz, v. 13, n. 4, p. 733-743, 1994.

LEE, J.; LEE, H-J.; SHIN, M-K.; RYU, W-S. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. **BioTechniques**, Erlangen, v. 36, p. 398-400, 2004.

LI, J.; WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **PLoS ONE**, Lake Alfred, v. 6, n. 7, e21804, 2011a.

LI, J.; WANG, N. Genome-Wide Mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Reveals Novel Genetic Determinants and Regulation Mechanisms of Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21804, 2011b.

LI, X.; DE BOER, S. H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. **Phytopathology**, Vancouver, v. 85, n. 8, p. 837-842, 1995.

LI, Y.; SCHOEFFLER, A. J.; BERGER, J. M.; OAKLEY, M. G. The Crystal Structure of the Hinge Domain of the *Escherichia coli* Structural Maintenance of Chromosomes Protein MukB. **JMB**, Bloomington, v. 395, p. 11-19, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12^a ed. Porto Alegre, SP, Artmed, 2010, p. 400, 446, 463, 472, 476-477.

MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S.; CHITSAZ, F.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, D.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research Advance Access**, Rockville Pike, Res 43: D222-D226. 2014.

MARQUES, L. L. R.; CERI, H.; MANFIO, G. P.; REID, D. M.; OLSON, M. E. Characterization of Biofilm Formation by *Xylella fastidiosa* In Vitro. **Plant Disease**, Calgary, v. 86, n. 6, p. 633-638, 2002.

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE J.; AMARAL, A. M. do; TABOGA, S. R.; FERREIRA, H. Sub cellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, Araraquara, v. 310, p. 76-83, 2010.

MASSARI, C. A.; BELASQUE-JÚNIOR, J. A campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo - situação atual e contaminação em viveiros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 27, n. 1, p. 41-55, 2006.

MEYER, D. F.; BOGDANOVA, A. J. Genomics-driven advances in *Xanthomonas* biology. In: JACKSON, R. W. (Ed.). **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Norwich, UK: Horizon Scientific Press, 2009. Chapter 7, p. 147-161.

MIKAELIAN, I.; SERGEAN, A. (1996) Modification of the overlap extension method for extensive mutagenesis on the same template. In: Trower MK (ed) In vitro mutagenesis protocols, v. 57, Humana, Totowa, NJ, p. 193-202.

MILLER, V. L.; MEKALANOS, J. J. A Novel Suicide Vector and Its Use in Construction of Insertion Mutations: Osmoregulation of Outer Membrane Proteins and Virulence Determinants in *Vibrio cholerae* Requires *toxR*. **Journal of Bacteriology**, Boston, v. 170, n. 6, p. 2575-2583, 1988.

MONASTERIO, L.; REIS, E. **Mudanças na concentração espacial das ocupações nas atividades manufatureiras no Brasil – 1872-1920**. Rio de Janeiro, 2008. Texto para discussão, n. 1361. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (ipea).

MOREIRA, L. M.; ALMEIRA JR, N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; MORAES, F. E.; OLIVEIRA, J. C.; SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE JUNIOR, R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; RODRIGUES NETO, J.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA JUNIOR, 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**, New York, v. 11, n. 238, p. 1-25, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-238>>.

MOREIRA, L. M.; SOUZA, R. F. de; ALMEIDA, N. F.; SETUBAL, J. C.; OLIVEIRA, J. C. F.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; SILVA, A. C. R. da. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annuals Reviews Phytopathology**, Virginia, v. 42, p. 163-184, 2004.

MORIYA, S.; TSUJIKAWA, E.; HASSAN, A. K. M.; ASAI, K.; KODAMA, T.; OGASAWARA, N. A *Bacillus subtilis* gene-encoding protein homologous to eukaryotic SMC motor protein is necessary for chromosome partition. **Molecular Microbiology**, Nara, v. 29, n. 1, p. 179-187, 1998.

MULCHANDANI, A.; LUONG, J. H. T.; LEDUY, A. Batch kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, Montreal, v. 32, p. 639-646, 1988.

MURRAY, T. S.; KAZMIERCZAK, B. I. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 2700-2708, 2008.

MYOUGA, F.; MOTOHASHI, R.; KUROMORI, T.; NAGATA, N.; SHINOZAKI, K. An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. **The Plant Journal**, Kanagawa, v. 48, p. 249-260, 2006.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] Acesso em: 15 Jan. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger, **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, p. 41, 89, 106, 2002.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: MARKESTRAT - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010. 138 p.

NIKI, H.; JAFFE, A.; IMAMURA, R.; OGURA, T.; HIRAGA, S. The new gene mukB codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. **The EMBO Journal**, Paris, v. 10, n. 1, p. 183-193, 1991.

OKUMURA, A.; SUZUKI, T.; MIYATAKE, H.; OKABE, T.; HASHIMOTO, Y.; MIYAKAWA, T.; ZHENG, H.; UNOKI-KUBOTA, H.; OHNO, H.; DOHMAE, N.; KABURAGI, Y.; MIYAZAKI, Y.; TANOKURA, M.; YAMAGOE, S. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein. **FEBS Letters**, Tokyo, v. 587, p. 404-409, 2013.

PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 26, n. 2, p. 21-217, 1974.

PARK, J. T.; UEHARA, T. How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Boston, v. 72, n. 2, p. 211-227, 2008.

PARK, P. W.; PIER, G. B.; HINKES, M. T.; BERNFIELD, M. Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. **Nature**, Houston, v. 411, p. 98-102, 2001.

PARK, P. W.; PIER, G. B.; PRESTON, M. J.; GOLDBERGER, O.; FITZGERALD, M. L.; BERNFIELD, M. Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 3057-3064, 2000.

PARKINSON, J. S; KOFOID, E. C. Communication modules in bacterial signaling proteins. **Annu. Rev. Gene**, v. 26, p. 71-112, 1992.

PARKINSON, N.; ARITUA, V.; HEENEY, J.; COWIE, C.; BEW, J.; STEAD, D. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. **International Journal Systematic and Evolution Microbiology**, London, v. 57, 2881-2887, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.65220-0>>.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786.

POTEMPA, J.; PIKE, R. N. (2005). Bacterial Peptidases. In: Concepts in Bacterial Virulence. (Russell W and Herwald H, eds.). Contrib. Microbiology Basel, Karger, v. 12, p. 132-180, 2005.

RAGUMANI, S.; KUMARAN, D.; BURLEY, S. K.; SWAMINATHAN, S. Crystal structure of a putative lysostaphin peptidase from *Vibrio cholerae*. **Proteins**, v. 72, 1096-1103, 2008.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, Cambridge, v. 290, n. 1, p. 205-218, 1993.

RIED, J. L.; COLLMER, A. An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in Gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. **Gene**, v. 51, p. 239-246, 1987.

RAMADURAI, L.; JAYASWAL, R. K. Molecular cloning, sequencing, and expression of *lytM*, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Illinois, v. 179, n. 11, p. 3625-3631, 1997.

RIGANO, L. A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SENDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P. S.; QÜESTA, J.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; VOJNOV, A. A.; MARANO, M. R. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Cork, v. 20, n. 10, p. 1222-1230, 2007.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, M-A. V.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 9, p. 344-355, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2558>>.

RODRIGUEZ, Ody.; et al. **Citricultura Brasileira**. 2ª. Ed. Campinas, SP, Fundação Cargill, 1991, v. 1, p. 492.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

SOARES, M. R.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, R. M.; MOREIRA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; MENEGHINI, R.; GOZZO, F. C. Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. **BioMed Proteome Science**, Campinas, v. 8, n. 55, 2010.

SOPPA, J.; KOBAYASHI, K.; NOIROT-GROS, M. F.; OESTERHELT, D.; EHRLICH, S. D.; DERVYN, E.; OGASAWARA, N.; MORIYA, S. Discovery of two novel families of proteins that are proposed to interact with prokaryotic SMC proteins, and characterization of the *Bacillus subtilis* family members ScpA and ScpB. **Molecular Microbiology**, Frankfurt, v. 45, n. 1, p. 59-71, 2002.

SOPPA, J. Prokaryotic structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: distribution, phylogeny, and comparison with MukBs and additional prokaryotic and eukaryotic coiled-coil proteins. **Gene**, Frankfurt, v. 278, p. 253-264, 2001.

SOUZA, E. C. **Análise da expressão gênica global em mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2010. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2010.

SUZUKI, K.; KIRISAKO, T.; KAMADA, Y.; MIZUSHIMA, N.; NODA, T.; OHSUMI, Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of *APG* genes is essential for autophagosome formation. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 5971-5981, 2001.

TIDHAR, A.; FLASHNER, Y.; COHEN, S.; LEVI, Y.; ZAUBERMAN, A.; GUR, D.; AFTALION, M.; ELHANANY, E.; ZVI, A.; SHAFFERMAN, A.; MAMROUD, E. The NlpD Lipoprotein Is a Novel *Yersinia pestis* Virulence Factor Essential for the Development of Plague. **PLoS ONE**, Ness-Ziona, v. 4, n. 9, e7023, 2009.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta* 1477: 98-111.

VERDIER, V.; RESTREPO, S.; MOSQUERA, G.; VÉRONIQUE, J.; LOPEZ, C. Recent progress in the characterization of molecular determinants in the *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*-cassava interaction. **Plant Molecular Biology**, Cali, v. 56, n. 4, p. 573-584, 2004.

WANG, X.; YANG, X.; YANG, C.; WU, Z.; XU, H.; SHEN, Y. Crystal Structure of Outer Membrane Protein NMB0315 from *Neisseria meningitides*. **PLoS ONE**, Beijing, v. 6, n. 10, e26845, 2011.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 2, p. 697–703, 1991.

WU, Q.; LAHTI, J. M.; AIR, G. M.; BURROWS, P. D.; COOPER, M. D. Molecular cloning of the murine BP-1/6C3 antigen: A member of the zinc-dependent metallopeptidase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Birmingham, v. 87, n. 3, p. 993-997, 1990.

YAN, Q.; WANG, N. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Lake Alfred, v. 25, n. 1, p. 69-84, 2012.

YAN, Q.; WANG, N. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of bacteriology**, Florida, v. 193, n. 7, p. 1590-1599, 2011.

ZHOU, X.; HU, X.; LI, J.; WANG, N. A Novel Periplasmic Protein, VrpA, Contributes to Efficient Protein Secretion by the Type III Secretion System in *Xanthomonas* spp. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Lake Alfred, v. 28, n. 2, p. 143-153, 2015.

ZIMARO, T.; THOMAS, L.; MARONDEDZE, C.; SGRO, G. G.; GAROFALO, C. G.; FICARRA, F. A.; GEHRING, C.; OTTADO, J.; GOTTIG, N. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. **BMC Microbiology**, Rosario, v. 14, n. 96, 2014.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C. **CITRICULTURA E AGRONEGÓCIO COOPERATIVO NO BRASIL**, v. 11, n. 11, p. 2290-2306, 2013.