



---

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

---

**EFEITO BACTERICIDA DO GALATO DE HEXILA SOBRE *Xanthomonas citri*  
subsp. *citri* E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO.**

**LÚCIA BONCI CAVALCA**

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

LÚCIA BONCI CAVALCA

**EFEITO BACTERICIDA DO GALATO DE HEXILA SOBRE *Xanthomonas citri*  
subsp. *citri* E SEU POTENCIAL NO CONTROLE DO CANCRO CÍTRICO.**

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

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Rio Claro

2018

576 Cavalca, Lúcia Bonci  
C376e Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e seu potencial no controle do cancro cítrico. / Lúcia Bonci Cavalca. - Rio Claro, 2018  
66 f. : il.

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

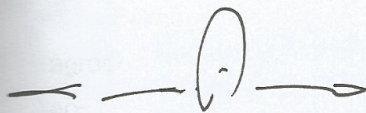
1. Micro-organismos. 2. Cancro cítrico. 3. Galato de alquila. 4. Cobre. 5. Segregação cromossômica. 6. Proteína ParB. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

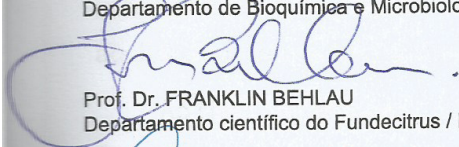
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Uso do galato de hexila como defensivo agrícola no controle da bactéria causadora do cancro cítrico

**AUTORA: LÚCIA BONCI CAVALCA**  
**ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA**

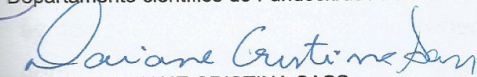
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: MICROBIOLOGIA APLICADA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Prof. Dr. FRANKLIN BEHLAU  
Departamento científico do Fundecitrus / Fundo de Defesa da Citricultura-Fundecitrus -SP



Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Rio Claro, 26 de fevereiro de 2018

Título alterado para: "Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* e potencial no controle do cancro cítrico"



## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Luis Octávio Regasini e a todo o pessoal do Laboratório de Química Verde e Medicinal, especialmente ao Carlos, pela síntese de todo o galato de hexila utilizado. Igualmente, sou grata à Msc. Lilian Amaral Lacerda, por todo o trabalho e empenho dedicados à construção das linhagens mutantes que utilizei neste trabalho; sem elas, ele seria incompleto.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC, pela doação das plantas utilizadas nos testes de aspersão e a todo o pessoal do Centro de Citricultura, em especial do Laboratório de Biotecnologia, por terem me recebido tão bem e contribuído com meu aprendizado durante o período de treinamento em que estive por lá.

Ao pessoal da Fundecitrus, pela doação dos nutrientes utilizados para manutenção das plantas e, especialmente, pela disponibilidade em compartilhar suas ideias e conhecimentos.

Pela troca de experiências, pelo companheirismo e por tantas e tantas ajudinhas, agradeço aos colegas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, em especial aos colegas do Laboratório de Genética de Bactérias. Agradeço também a todos que confiaram na minha experiência e tentaram aprender um pouco com ela (em especial ao Julio, que aturou minha co-orientação).

Ao Nael, por ter participado desse mestrado de tantas maneiras, do apoio moral às faxinas (escapou de aplicar veneno na estufa, né), agradeço com carinho e admiração. Aos amigos, por compartilharem das empolgações e frustrações (e por ficarem felizes com a minha comida), me sinto, além de agradecida, afortunada. Somos especiais à nossa maneira... e nos merecemos!

E de maneira muito especial agradeço ao professor Henrique Ferreira, pelas orientações neste trabalho e para toda a vida e carreira... Henrique, te agradeço imensamente pela confiança, pelas broncas, pelas ideias, oportunidades e todo o apoio que me ajudam a ser hoje (pelo menos um pouco) mais profissional.

## SUMÁRIO

	pág
<b>CAPÍTULO I: Efeito bactericida do galato de hexila sobre <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>.</b>	<b>7</b>
Resumo	7
Abstract	7
1.1 INTRODUÇÃO	8
1.2 OBJETIVOS	12
1.3 MATERIAL E MÉTODOS	13
1.3.1 Compostos químicos	13
1.3.2 Linhagem bacteriana e condições de cultivo	14
1.3.3 Inibição do crescimento <i>in vitro</i> de Xac	14
1.3.4 Indução de resistência <i>in vitro</i>	15
1.3.5 Taxa de mutantes naturais resistentes	16
1.3.6 Fitotoxicidade sobre germinação de sementes e folhas	16
1.3.7 Potencial protetivo e curativo <i>in planta</i>	16
1.3.8 Análise de viabilidade celular	17
1.3.9 Análises estatísticas	17
1.4 RESULTADOS	18
1.4.1 O galato de hexila	18
1.4.2 Gal-6 afeta o padrão de crescimento populacional de Xac	18
1.4.3 Gal-6 apresenta ação bactericida <i>in vitro</i> contra Xac	20
1.4.4 Xac não desenvolveu resistência <i>in vitro</i> ao galato de hexila	22
1.4.5 Taxa de mutantes naturais resistentes	24
1.4.6 A germinação de sementes não foi alterada por Gal-6	24
1.4.7 Gal-6 apresentou atividades protetiva e curativa <i>in planta</i>	26
1.4.8 Gal-6 altera comprimento celular e permeabilidade de membrana	28
1.5 DISCUSSÃO	29
1.6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	33
<b>CAPÍTULO II: O galato de hexila atua sobre a patogenicidade de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> por meio da perturbação do segrossomo?</b>	<b>39</b>
Resumo	39
Abstract	39
2.1 INTRODUÇÃO	40
2.2 OBJETIVOS	42
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	42
2.3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	42
2.3.2 Análise da ação indutora da arabinose	43
2.3.3 Análise de presença da proteína ParB por western blot	44

2.3.4	Análise de presença de transcritos <i>parB</i> por RT-PCR	44
2.3.5	Morfologia celular	44
2.3.6	Avaliação da motilidade	45
2.3.7	Avaliação de patogenicidade dos mutantes <i>in planta</i>	45
2.3.8	Análises estatísticas	45
2.4	RESULTADOS	46
2.4.1	A perturbação de ParB altera o comportamento populacional de Xac	46
2.4.2	A indução por arabinose se inicia gradualmente	47
2.4.3	Xac $\Delta parB amy::pLAL6$ produz a proteína ParB somente sob indução	48
2.4.4	Xac $\Delta parB amy::pLAL6$ não produz transcritos de <i>parB</i> quando inibida	49
2.4.5	Morfologia e viabilidade celular	50
2.4.6	O excesso de ParB reduziu a motilidade <i>in vitro</i> de Xac	51
2.4.7	A patogenicidade de Xac não é alterada pela depleção de ParB	52
2.5	DISCUSSÃO	54
2.6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	56
	<b>Anexo: Protein depletion using the arabinose promoter in <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>.</b>	<b>58</b>

## **CAPÍTULO I: Efeito bactericida do galato de hexila sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.**

### **Resumo**

A cultura de citros é uma das mais importantes do Brasil, sendo a citricultura brasileira a maior do mundo; ainda assim, a produção nacional sofre com pragas e doenças, como cancro cítrico, que afetam sua produtividade. O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) e tem sido controlado com o uso de estratégias integradas como a eliminação de plantas contaminadas e pulverização de bactericidas cúpricos. O uso de compostos à base de cobre, porém, representa um risco ambiental devido à sua toxicidade e efeito cumulativo, fazendo necessária a investigação de outros compostos com potencial no tratamento fitossanitário contra a doença. Neste estudo avaliamos a atividade bactericida do galato de hexila contra Xac, seu potencial protetivo e curativo no combate ao cancro cítrico, sua fitotoxicidade e predisposição em induzir resistência bacteriana. O composto provocou retardo e diminuição no crescimento populacional de Xac e inibição de seu crescimento *in vitro*, levando à morte total da população na concentração de  $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . A bactéria não foi capaz de desenvolver resistência a Gal-6 ao longo de 31 dias e exibiu taxa de mutantes naturalmente resistentes ao composto menor que  $1 \cdot 10^{-6}$  para a concentração de  $50\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . A capacidade de germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de rúcula e tomate não foi alterada por Gal-6. A aspersão de galato de hexila em plantas de laranja doce inoculadas com Xac reduziu em até 35% a incidência de sintomas de cancro cítrico, e em até 80% sua severidade. O composto também alterou o comprimento celular de Xac e permeabilidade de membrana. Galato de hexila mostrou-se um bactericida eficaz contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tanto *in vitro* quanto *in planta*, além de apresentar baixa fitotoxicidade e baixa probabilidade de indução de resistência em Xac, visto que o composto parece atuar tanto sobre a estrutura física da membrana, quanto sobre o processo de segregação cromossômica/divisão celular bacteriana.

palavras-chave: cancro cítrico, galatos de alquila, cobre

### **Abstract**

Citrus culture is one of the most important agricultural activities in Brazil, being the country also the biggest producer in the world; nevertheless, this business struggles with pests and diseases, as citrus canker, that affects its profitability. Citrus canker is caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) and is controlled by using integrated strategies such as elimination of contaminated plants and spraying of cupric bactericides. Using products with copper, however, brings an environmental risk, given

its toxicity and cumulative effect, making necessary the research of other compounds with potential to be used as a resource in the phytosanitary treatment against the disease. We evaluated hexyl galate's (Gal-6) bactericidal activity *versus* Xac and its potential in the preventive and curative treatments against the disease, also Gal-6 phytotoxicity and likeliness to induce bacterial resistance. The compound caused delay and decrease in Xac population growth and *in vitro* growth inhibition, leading to the total death of the population when at  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The bacterium was not able to develop resistance to Gal-6 over 31 days and exhibited a rate of naturally-resistant mutants to the compound of less than  $1 \cdot 10^{-6}$  at the concentration of  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Seed germination and seedling development of arugula and tomato were not altered by Gal-6. Spraying orange plants infected by Xac with hexyl gallate reduced the incidence of citrus canker symptoms by up to 35% and their severity by up to 80%. The compound also altered Xac cell length and membrane permeability. Hexyl gallate proved to be an effective bactericide against *Xanthomonas citri* subsp. *citri* both *in vitro* and *in plant*, exhibiting low phytotoxicity and low inclination to induce resistance in Xac, given that the compound appears to act on both the physical structure of the membrane and the process of chromosomal segregation/ bacterial cell division.

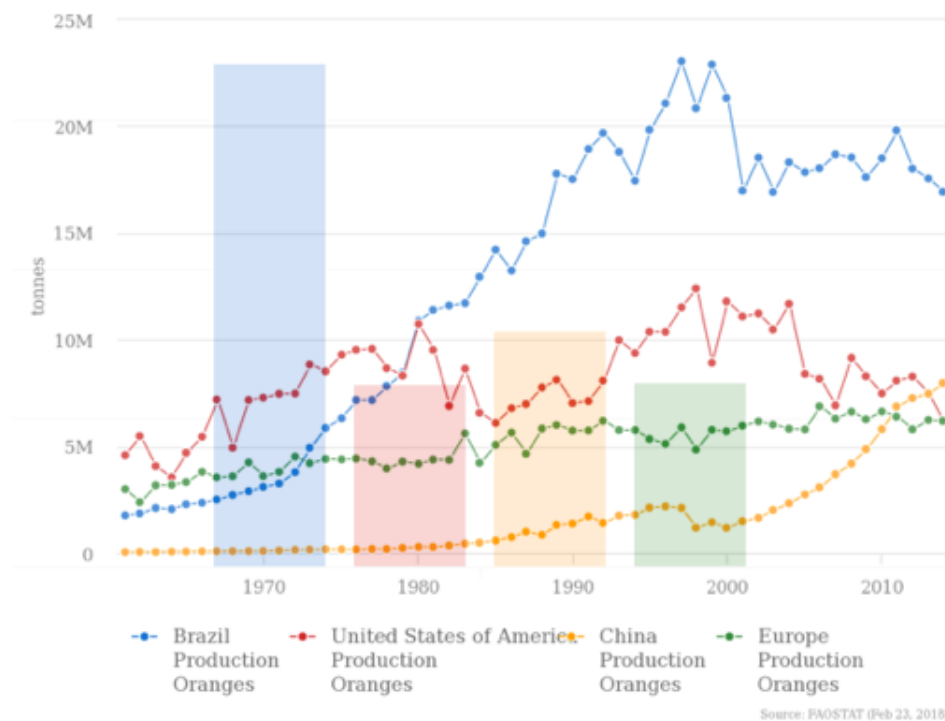
key words: citrus canker, alkyl gallates, copper.

## 1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores mundiais de laranjas desde o início da década de 1980 (Figura 1.1), quando ultrapassou a produção obtida pelos Estados Unidos e quando a cultura passou a ser a quinta mais produzida do país (FAO, 2015). O país é atualmente responsável pela produção de cerca de 25% dos 70 milhões de toneladas de laranjas produzidas no mundo (FAO, 2015; IBGE, 2016), sendo a produção somente do estado de São Paulo equivalente a mais de 15% da produção mundial (representando mais de 70% da produção brasileira). Até o final da década de 90, havia uma tendência gradual e constante de crescimento da produção de laranjas no Brasil, que rompeu-se, porém, no início dos anos 2000 (com uma queda de cerca de 20% no ano de 2001) e, desde então, a produção vem sofrendo flutuações ano a ano (FAO, 2015; IBGE, 2016) - em decorrência, principalmente, de flutuações climáticas - e vem sendo ameaçada pela disseminação de doenças como o cancro cítrico, provocado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD *et al.*, 2005; 2006).



**Figura 1.1** - Produção de laranjas (em toneladas) do Brasil, Estados Unidos, China e Europa: as linhas mostram a produção ao longo das últimas cinco décadas enquanto as barras representam a produção em 2016.



Fonte: FAOSTAT (Feb 23, 2018).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é o agente etiológico do cancro cítrico asiático, forma mais severa e disseminada da doença que acomete plantas do gênero *Citrus* em diversas regiões do mundo, com maior ou menor severidade, provocando lesões cloróticas e necróticas (Figura 1.2) nos ramos, folhas e frutos (GOTTWALD et al., 2002; DAS, 2003). Em decorrência da doença, os frutos perdem valor de mercado ou caem prematuramente. A perda econômica é ainda maior se considerarmos os gastos com o controle da doença, que incluem a eliminação de plantas infectadas, aspersão de compostos químicos, limpeza de equipamentos e manejo (BEHLAU et al., 2007; BELASQUE Jr et al, 2009; SANCHES et al., 2014). Além disso, o impedimento do trânsito e comercialização de frutos provenientes de áreas com ocorrência de cancro é uma das limitações mais importantes e de maior impacto na atividade cítrica (SANCHES et al., 2014; del CAMPO et al., 2009).

**Figura 1.2** - Sintomas de cancro cítrico: manchas eruptivas em folhas e ramos.



acervo pessoal

O cancro cítrico tem sido controlado, desde que foi diagnosticado pela primeira vez no Estado de São Paulo, em 1957, com medidas para eliminação das plantas infectadas, outras plantas ao seu redor ou até mesmo de todo o pomar, dependendo do nível de incidência da doença (BELASQUE Jr *et al*, 2009). No esforço de se erradicar o cancro cítrico e evitar sua disseminação pelo país, o Ministério da Agricultura estabeleceu em sua Portaria MA-291, de 23 de julho de 1997 que, nos pomares onde fosse constatada a presença da doença, as plantas contaminadas e adjacentes deveriam ser eliminadas, submetidas à poda drástica/desfolha química e/ou pulverização com suspensão cúprica. A medida de eliminação das plantas contaminadas foi instituída em todo o Estado de São Paulo, por meio da Resolução CEE-CANECC/SP-1 de 20 de março 2000: nos talhões em que o percentual de plantas contaminadas fosse igual ou inferior a 0,5%, deveriam ser eliminadas as plantas em um raio de 30 metros a partir do foco de contaminação; nos casos de incidência superior a 0,5% todo o talhão deveria ser eliminado.

A aceitação do programa de erradicação encontrou resistência por parte de citricultores (BELASQUE Jr. *et al.*, 2009), resultando no abrandamento das exigências do Estado de São Paulo para erradicação do cancro cítrico. Ainda em concordância com o que havia sido determinado pela Portaria MA-291 de 23/07/1997, ficou estabelecido pela Resolução SAA-147, de 31 de outubro de 2013, que apenas a planta acometida pela doença seria obrigatoriamente eliminada e aquelas adjacentes (em um raio de 30 metros) seriam pulverizadas com suspensão cúprica. A partir de

então, devido à alta incidência do cancro cítrico e das perdas provocadas pela eliminação das plantas acometidas, o controle tem sido feito predominantemente com pulverizações de solução cúprica (BEHLAU *et al*, 2017).

Com o objetivo de reduzir o risco de contaminação de áreas ainda livres da doença e ao mesmo tempo permitir o trânsito e comercialização de frutos provenientes de áreas com ocorrência do cancro cítrico, no início de 2017 entrou em vigor a Instrução Normativa nº 37 (IN-37) do Ministério da Agricultura, de 5 de setembro de 2016, adequando as exigências à realidade dos produtores brasileiros. Tal normativa reconhece quatro status fitossanitários relativos ao cancro cítrico: I) área com praga ausente, II) área livre da praga, III) área sob erradicação ou supressão e IV) área sob sistema de mitigação de risco (SMR). O Estado de São Paulo foi oficializado como Área sob Sistema Integrado de Medidas Fitossanitárias para o Manejo de Risco - ou Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR) - pela Resolução SAA-10, de 20 de fevereiro de 2017 (SÃO PAULO, 2017), sujeitando-se à observação das medidas propostas pela IN-37 para tais áreas. As medidas de manejo integrado de risco propostas pela IN-37 incluem: a) uso de cultivares menos suscetíveis, b) destruição de frutos contaminados, c) tratamentos fitossanitários preventivos, d) manejo integrado da larva minadora, e) desinfecção de ferramentas e máquinas e f) uso de quebra-ventos (BRASIL, 2016).

Não se conhece nenhuma variedade cítrica imune ao cancro cítrico (YANG *et al.*, 2011), embora apresentem diferentes graus de resistência ou susceptibilidade à doença. Vargas e colaboradores (2013) avaliaram a susceptibilidade de 80 cultivares de citros, evidenciando aqueles mais indicados para processos de melhoramento genético contra a doença. O uso de tais cultivares menos susceptíveis ao cancro cítrico, porém, não se apresenta como solução viável para os pomares atualmente já estabelecidos, dado que o processo de melhoramento demanda altos investimentos e décadas de pesquisa até se alcançar seus resultados. Da mesma maneira, cultivares modificados geneticamente para aquisição de resistência contra o cancro cítrico parecem distantes de serem obtidos (OLIVEIRA *et al*, 2014), pois ainda se desconhecem genes de resistência que possam ser empregados em tais métodos (YANG *et al.*, 2011). Além disto, produtos oriundos de plantas geneticamente modificadas são passíveis de enfrentar problemas de resistência à aceitação pelos mercados (ODA e SOARES, 2001). O Plantio de quebra-ventos como barreira natural

ao espalhamento do cancro, uma alternativa não agressiva ao ambiente, oferece uma barreira física à dispersão da bactéria pelos ventos e auxilia também na redução de ferimentos pelos quais Xac poderia penetrar nas plantas (GOTTWALD & TIMMER, 1995; BOCK et al., 2010). Finalmente, as formulações de bactericidas cúpricos (hidróxido de cobre ou oxicloreto de cobre) têm sido a alternativa mais eficiente e mais utilizada pelos produtores (BEHLAU *et al.*, 2017), porém seu uso apresenta sérias desvantagens, como a promoção do surgimento de cepas de Xac resistentes ao produto (CANTEROS, 1999; MENEGUIM *et al.*, 2007 ALVA et al, 1993), o acúmulo de resíduos nos frutos e solo, a contaminação de cursos d'água, além dos custos das aplicações frequentes do produto. Tratamentos fitossanitários preventivos com bactericidas à base de cobre permanecem como a medida de manejo mais utilizada atualmente (FERENCE et al., 2017), porém, o uso de formulações cúpricas pode acarretar diversas consequências prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente, tornando urgente e necessário que se desenvolvam novos compostos biorracionais para se controlar a crescente disseminação do cancro cítrico, mitigando danos ambientais e também danos econômicos para a citricultura.

Nosso grupo demonstrou recentemente que ésteres de ácido gálico (3,4,5-ácido trihidroxibenzóico; galatos de alquila) são capazes de perturbar os mecanismos de divisão celular e/ou a segregação cromossômica de Xac (SILVA *et al.*, 2013 e KRÓL *et al.*, 2015) e, com isto, observamos a perda da capacidade de Xac de induzir sintomas de cancro. O ácido gálico é um componente do metabolismo secundário de plantas que pode ser encontrado tanto na forma livre ou como parte de polifenóis hidrolisáveis. Desta forma, é racional que a utilização de ésteres de ácido gálico como defensivos agrícolas resultaria em menos resíduos acumulados no meio ambiente, quando comparados a outros agentes bioativos e, portanto, a utilização de galatos de alquila representaria uma alternativa ao uso das suspensões a base de cobre.

## 1.2 OBJETIVOS

Avaliar a atividade bactericida do galato de hexila frente à bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, seu potencial contra o cancro cítrico, sua fitotoxicidade e predisposição em induzir resistência bacteriana.

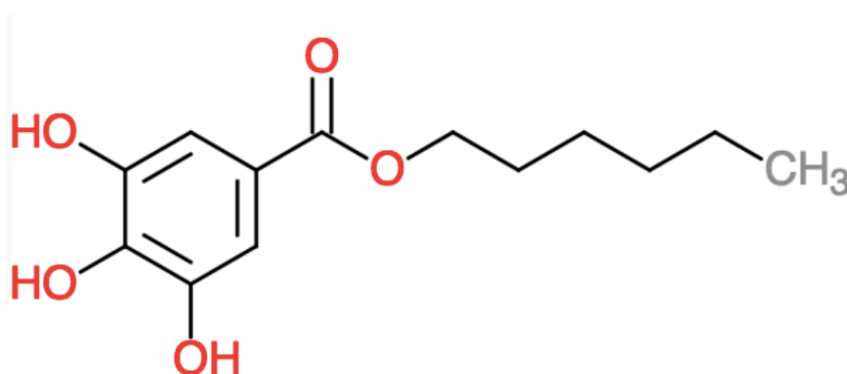
## 1.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.3.1 Compostos químicos

Galato de hexila - o composto foi produzido em colaboração com professor Dr. Luis Octávio Regasini (FAPESP/NWO 2013/50367-8), no Laboratório de Química Verde e Medicinal do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP/São José do Rio Preto, de acordo com metodologias já descritas (MORAIS et al, 2010; XIMENES et al, 2010). A solubilidade do composto em soluções aquosas e solventes orgânicos foi avaliada e os estoques de trabalho foram preparados na concentração de  $60\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  em três diferentes solventes: glicerol, dimetilsulfóxido e etanol.

Galato de hexila é um produto semissintético resultante da esterificação de ácido gálico com hexano, formado por um anel fenólico com 3 hidroxilas (nas posições 3, 4 e 5) unido ao radical de seis carbonos ( $\text{CH}_2$ )<sub>5</sub>CH<sub>3</sub> por um grupo éster (Figura 1.3).

**Figura 1.3** - Fórmula estrutural do galato de hexila (Gal-6)



fórmula elaborada com o software ChemDoodle 2D Sketcher

Oxicloreto de cobre - o composto foi utilizado na forma do produto comercial Difere, cedido pelo fabricante Oxiquímica. O estoque de trabalho foi preparado pela diluição do produto na proporção 1:10 em água deionizada autoclavada, resultando em uma concentração de  $35\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de cobre metálico.

Canamicina - sulfato de canamicina Sigma-Aldrich, mantida em solução estoque a  $-20^\circ\text{C}$  na concentração de  $20\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Etanol, glicerol e dimetilsulfóxido - Merck, concentrações comerciais de 99,5%, 80% e 99,9% respectivamente.



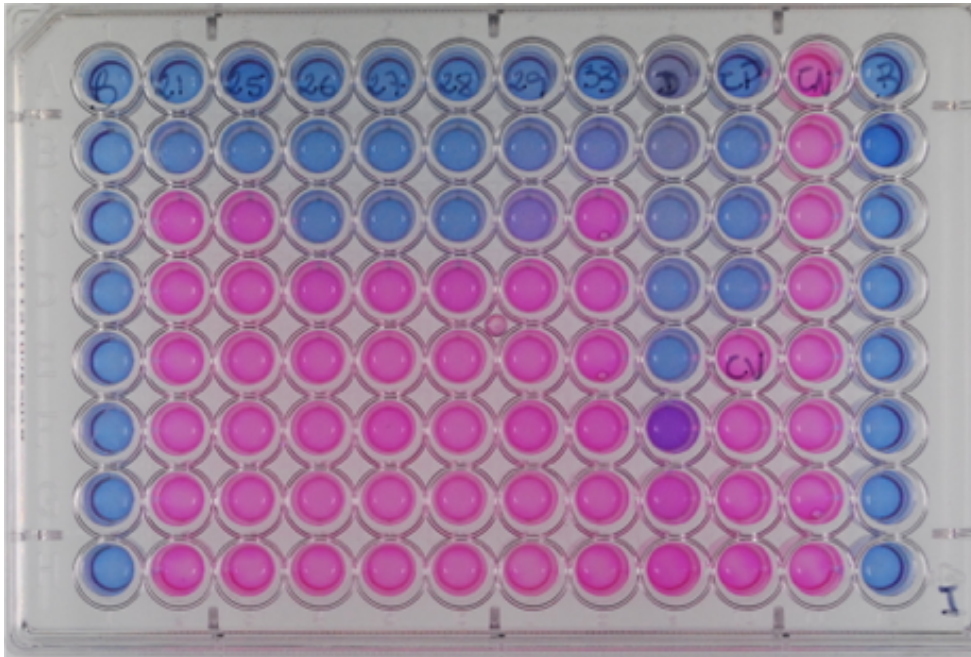
### 1.3.2 Linhagem bacteriana e condições de cultivo

A linhagem selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 sequenciada por da Silva et al. (2002) - Xac WT foi cultivada em meio NYG (nitrogen-yeast-glycerol:  $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de peptona,  $3\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de extrato de levedura, 2% de glicerol) ou NYG-ágar (NYG acrescido de  $15\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  de ágar) a  $\sim 29^\circ\text{C}$ . Os períodos de incubação foram de 12 a 14h quando em meio líquido (sob agitação de 180-200rpm) ou 48h quando em NYG-ágar. Para as curvas de crescimento bacteriano, Xac foi incubada *overnight*, tendo sua  $\text{DO}_{600}$  ajustada para  $\sim 0,1$  no momento inicial da curva, com adição de Gal-6 em diferentes concentrações (variando de 10 a  $70\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Como controles positivo, negativo e de solvente foram utilizados, respectivamente, oxicloreto de cobre, meio de cultivo e etanol 1%. As curvas foram realizadas em leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek), com leituras de  $\text{DO}_{600}$  a cada 30min por 48h; foram utilizadas placas multiwell de 24 poços com volume final de 1,5mL/poço. Alíquotas do cultivo em crescimento ao longo da curva foram retiradas para contagem de UFC.

### 1.3.3 Inibição do crescimento *in vitro* de Xac

A capacidade de inibição do crescimento *in vitro* de Xac foi verificada e a concentração inibitória determinada pelo método fluorimétrico Resazurin Microtiter Assay (REMA), de acordo com o descrito por Palomino et al (2002) e Silva e Ferreira (2013), com modificações: em placas de 96 poços, foram feitas diluições seriadas de galato de hexila e de oxicloreto de cobre ( $100 - 0,78\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) em meio NYG, sendo em seguida inoculadas  $10^5$  células de Xac por poço (100 $\mu\text{L}$  de volume final). As placas foram incubadas por 12-14h a  $29^\circ\text{C}$  e após esse período foi aplicada a solução de resazurina (concentração final de  $\sim 15\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Após adição do corante, as placas seguiram em incubação por uma a duas horas, para que as células viáveis metabolizassem a resazurina (azul), reduzindo-a a resorufina (rosa) (Figura 1.4), cuja concentração relativa foi determinada por meio de leitura de fluorescência em leitor de microplacas Synergy H1 (excitação em 530nm, emissão em 590nm), permitindo assim o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento celular em cada poço. A relação entre concentração dos compostos e porcentagem de inibição celular deu origem a curvas que puderam ser descritas por funções logísticas, sendo estas utilizadas para cálculo das ICs; como controles positivo, negativo e de solvente foram utilizados, respectivamente, canamicina, meio de cultivo e etanol 1%.

**Figura 1.4** - Placa com ensaio de REMA.



acervo pessoal

Para avaliação da natureza da atividade inibitória, foi aplicado o método de concentração mínima bactericida/bacteriostática - MBC: após tratamento e incubação para o teste de REMA (SILVA e FERREIRA, 2013), Xac foi inoculada em placa com meio NYG (150x15mm) com auxílio de um replicador de placas (carimbo) e incubada por 24-48h a 29°C para confirmação de presença/ausência de crescimento bacteriano (MORÃO et al., 2016).

#### **1.3.4 Indução de resistência *in vitro***

Para investigar a possibilidade de ocorrência de indução de resistência bacteriana provocada pelo composto, Xac foi cultivada sob concentrações não letais crescentes de Gal-6 ao longo de 31 dias, segundo teste de indução branda de resistência descrito por Oz et al. (2014), com modificações: em placa de 96 poços, foram inoculadas  $10^5$  células/poço (100µL de volume final) em meio de cultivo adicionado de Gal-6 nas concentrações de 7.5, 15, 30, 60 e 120µg/mL. A cada período de incubação de 48h, o crescimento bacteriano era verificado pela presença/ausência de turbidez visível e confirmado por plaqueamento seguido de incubação; as populações que apresentassem crescimento visível eram então reinoculadas, em proporção de 1:10 em novo meio de cultivo com concentração de galato de hexila igual ou mais alta do composto.

### 1.3.5 Taxa de mutantes naturais resistentes

Em placas de 12 poços, foram feitas diluições seriadas de galato de hexila em meio NYG-ágar a partir da concentração de  $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  até  $12,5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  em volume final de 1mL por poço. Em cada poço, foram inoculados 10 $\mu\text{L}$  de uma suspensão de Xac WT à concentração de  $10^8$  células  $\cdot \text{mL}^{-1}$ . Após incubação por 48h a 29°C, foi feita contagem de número de colônias e cálculo das taxas percentuais de mutantes naturais resistentes à cada concentração do composto.

### 1.3.6 Fitotoxicidade sobre germinação de sementes e folhas

Em placas petri estéreis, foram dispostas 10 sementes/placa sobre papel de filtro estéril umedecido com água de torneira autoclavada, sendo então aplicado 1mL de Gal-6 a  $600\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; como controles positivo, negativo e de solvente foram utilizados, respectivamente, oxiclreto de cobre ( $600\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de cobre metálico), água de torneira autoclavada e etanol 1%. As placas foram mantidas tampadas durante o desenvolvimento das sementes, em casa de vegetação própria, sendo umedecidas com água de torneira autoclavada quando necessário. Foram utilizadas sementes comerciais de rúcula (*Eruca sativa*), tomate cereja (*Solanum lycopersicum*) e alface variedade grand rapids (*Lactuca sativa*), marca Isla Pak.

Para avaliação da fitotoxicidade em folhas, brotações de plantas jovens foram aspergidas com Gal-6 a  $600\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  e observadas ao longo de 60 dias; como controles positivo, negativo e de solvente foram utilizados, respectivamente, oxiclreto de cobre ( $600\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de cobre metálico), água de torneira autoclavada e etanol 1%. Os ramos foram observados quanto ao aparecimento de manchas, murcha, ressecamento ou queda de folhas.

### 1.3.7 Potencial protetivo e curativo *in planta*

Teste protetivo - brotos jovens de laranja doce, em estágio de desenvolvimento vegetativo V4 a V5 (FUNDECITRUS) foram aspergidos com Gal-6 na concentração de  $600\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  até o ponto de escorrimento (cerca de 20-30mL por planta). Como controles positivo e de solvente foram utilizados, respectivamente, oxiclreto de cobre ( $600\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de cobre metálico) e etanol 1% ou glicerol 1%. Após 24h estes brotos foram aspergidos com suspensão de Xac em NaCl 0,85% com densidade óptica a 600nm de 0,4, equivalente a uma concentração aproximada de  $10^8$  células  $\cdot \text{mL}^{-1}$

(BELASQUE Jr & JESUS Jr, 2006) até o ponto de escorrimento (cerca de 20-30mL por planta). As plantas foram mantidas cobertas com sacos plásticos transparentes pelas 24h seguintes, garantindo as condições de temperatura/umidade ideais para infecção por Xac. O desenvolvimento dos sintomas foi observado ao longo de um período de 30 dias; o percentual de folhas sintomáticas e número de lesões foram registrados. Teste curativo - brotos jovens foram aspergidos com Xac ( $\sim 10^8$  células  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>), cobertos com sacos plásticos transparentes por cerca de 24h e aspergidos com Gal-6 48h após inoculação, mantendo-se todas as condições descritas para o teste protetivo. Utilizamos plantas jovens de *Citrus sinensis* (laranja doce, variedade Pera) enxertadas em *Citrus limonia* (limão-cravo), mantidas em casa de vegetação própria (FAPESP 2013/14013-7). As plantas foram cedidas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira, do Instituto Agronômico de Campinas.

### **1.3.8 Análise de viabilidade celular**

Para verificação da viabilidade celular de Xac em presença de galato de hexila, amostras de Xac WT foram coletadas na fase de crescimento exponencial ( $DO_{600} \sim 0,4$ ), diluídas em meio de cultivo na proporção 1:10 e tratadas com diferentes concentrações do composto: IC<sub>12,5%</sub> - IC<sub>25%</sub> - IC<sub>50%</sub> - IC<sub>90%</sub>. Como controle negativo utilizamos amostras sem tratamento com Gal-6. Os tratamentos foram mantidos em incubação para observações a cada 1h ao longo de 3h. No momento de cada observação, as amostras eram concentradas por centrifugação e ressuspendidas em solução com os corantes SYTO9 e iodeto de propídio, seguindo as recomendações do kit de viabilidade celular Live/Dead BacLight (Molecular Probes L7007). Após coradas, as amostras foram imobilizadas em lâminas com agarose 0,9% (MARTINS et al., 2010) e observadas. Todas as observações foram feitas em microscópio Olympus BX-61 equipado com câmera monocromática Orca-Flash 2.8 (Hamamatsu) e filtros DAPI/FITC e TXRED e a captura e processamento das imagens realizado com uso do software Cell Sens Dimension versão 11 (Olympus).

### **1.3.9 Análises estatísticas**

As curvas de crescimento populacional foram construídas por regressão não-linear suavizada (LOWESS) com uso do software Graphpad Prism 6; a coleta de dados foi realizada em triplicata. O software Microsoft Excel para Mac versão 15.30 foi utilizado para cálculo de porcentagem de inibição celular, construção da curva

logística dose-resposta e cálculo de ICs baseados nas médias de três repetições independentes. Os experimentos de indução de resistência *in vitro* tiveram avaliação qualitativa (presença/ausência de colônias) e foram realizados em triplicatas. As taxas de mutantes naturais foram calculadas pela média de 3 repetições independentes. Os resultados do teste de germinação de sementes foram avaliados por meio de ANOVA seguida de teste de comparações múltiplas de Dunn, com uso do software Graphpad Prism 6. Os dados de porcentagem de folhas sintomáticas e número de lesões por folha sintomática nos testes preventivos e curativo foram plotados com uso do software Microsoft Excel para Mac versão 15.30.

## **1.4 RESULTADOS**

### **1.4.1 O galato de hexila**

Na concentração estoque de  $60\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , o composto mostrou-se insolúvel em água, NaCl 0,85% ou tampões aquosos como PBS, sendo possível o preparo de estoques somente em solventes orgânicos como glicerol, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO). Gal-6 apresentou completa dissolução nos solventes etanol e DMSO na concentração de  $60\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e temperatura ambiente; em glicerol, entretanto, a dissolução de Gal-6 foi obtida somente com aquecimento da mistura a  $40^{\circ}\text{C}$  e sonicação em banho por 15 minutos. Nenhuma das soluções estoque formou precipitado mesmo após resfriamento. Em testes preliminares, etanol mostrou-se o solvente mais adequado ao uso neste trabalho.

### **1.4.2 Gal-6 afeta o padrão de crescimento populacional de Xac**

Para determinar o padrão de crescimento populacional de Xac WT, registramos a densidade óptica ( $\text{OD}_{600}$ ) e o número de unidades formadoras de colônia de diferentes populações ao longo do tempo ( $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), estabelecendo uma relação entre esses três fatores (Figura 1.5).

O padrão de crescimento populacional de Xac foi alterado na presença de galato de hexila (Figura 1.6), sendo que a  $\text{DO}_{600}$  máxima atingida na concentração de  $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $\sim\text{IC}_{50\%}$ , ver item 1.4.3 a seguir) foi aproximadamente 20% abaixo do padrão sem tratamento e o tempo até o início da fase estacionária/morte foi 20% mais



longo que o padrão; com uma concentração de  $60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $\sim\text{IC}_{90\%}$ ), a redução na  $\text{DO}_{600}$  foi de cerca de 30%, enquanto a fase estacionária foi alcançada em quase duas vezes e meia o tempo de crescimento padrão.

**Figura 1.5** - Curva padrão de crescimento populacional de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em cultivo a  $29^\circ\text{C}$  em meio NYG; aqui estão correlacionados os valores médios de densidade óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) e o número de unidades formadoras de colônia ( $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ao longo do tempo. A seta indica a densidade óptica de 0,4, utilizada na maior parte dos experimentos.

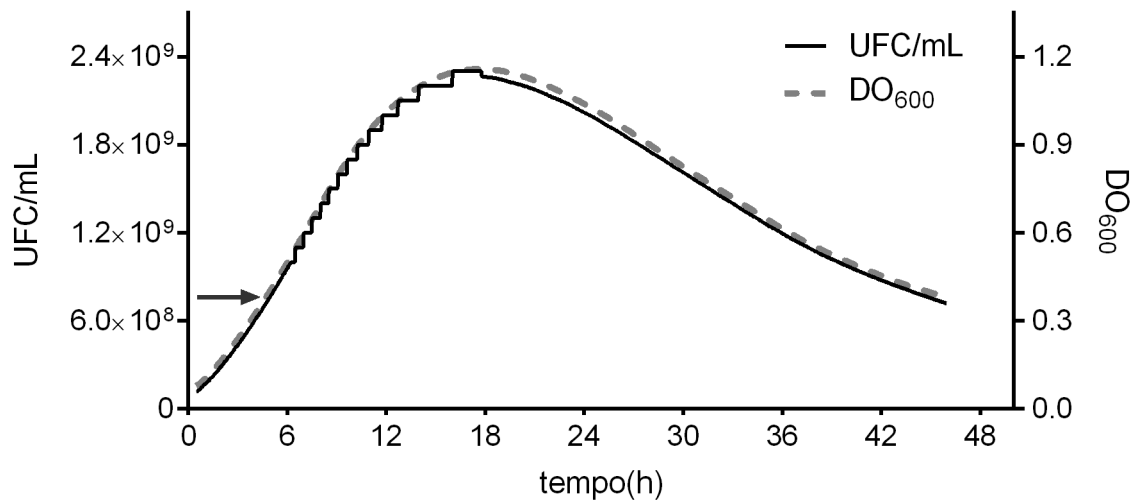


gráfico elaborado com Graphpad Prism 6

**Figura 1.6** - Curvas de crescimento populacional de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em cultivo a partir de  $\text{DO}_{600}\sim 0,1$  com galato de hexila a  $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Gal-6  $\text{IC}_{50\%}$ ) e  $60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Gal-6  $\text{IC}_{90\%}$ ), comparadas ao oxiclreto de cobre em  $\text{IC}_{90\%}$  (Difere) e controles negativo (sem tratamento) e do solvente (etanol 1%).

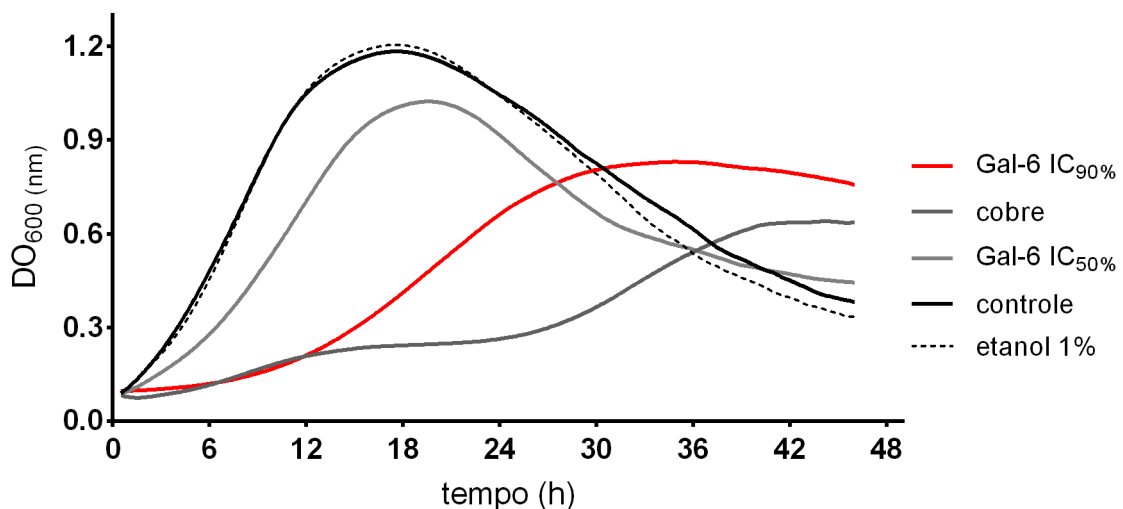


gráfico elaborado com Graphpad Prism 6

### 1.4.3 Gal-6 apresenta ação bactericida *in vitro* contra *Xac*

Nos ensaios de REMA, galato de hexila foi capaz de inibir completamente o crescimento celular de *Xac* na concentração de  $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , exibindo leve efeito inibitório (até 10%) nas concentrações abaixo de  $12,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a taxas de inibição acima dos 80% na concentração de  $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figura 1.7). Verificamos um padrão dose-resposta não linear de Gal-6 *versus* *Xac* (Figura 1.8) semelhante ao observado para oxicloreto de cobre.

A atividade inibitória de Gal-6 mostrou variações entre os diferentes solventes utilizados (glicerol, DMSO e etanol), sendo moderadamente mais alta para os estoques preparados em glicerol (Figura 1.7).

A extrapolação das taxas de inibição verificadas pelo teste de REMA permitiu a definição das concentrações mínimas de galato de hexila capazes de inibir 90% ( $\text{IC}_{90\%}$ ) e 50% ( $\text{IC}_{50\%}$ ) do metabolismo/crescimento celular de *Xac* (Figura 1.8), sendo sua  $\text{IC}_{90\%}$  aproximadamente  $60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $\text{IC}_{50\%}$  cerca de  $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (estoques em etanol). A atividade inibitória de galato de hexila foi consistentemente similar à do oxicloreto de cobre, cujas concentrações inibitórias para 90% e 50% da população foram respectivamente de  $\sim 40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $\sim 30\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

**Figura 1.7** - Inibição de crescimento celular de *X. citri* subsp. *citri* por galato de hexila em diferentes concentrações e solventes (glicerol, DMSO e etanol), comparado ao oxicloreto de cobre (Difere).

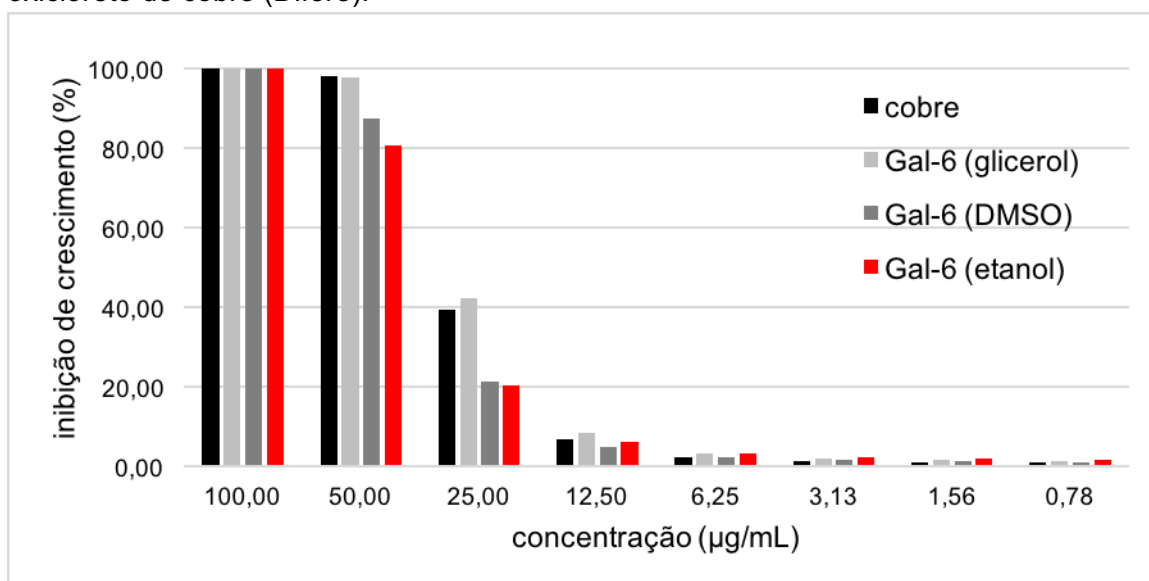


gráfico elaborado com Microsoft Excel para Mac versão 15.30

**Figura 1.8** - Curva de inibição de crescimento celular de *X. citri* subsp. *citri* por galato de hexila (estoque em etanol); a linha pontilhada é descrita pela função logística  $x = -9,01 \cdot \ln((0,1 \cdot (100 - y)) / (y \cdot 99,9)) - 25$  e representa o comportamento experimental (linha contínua).

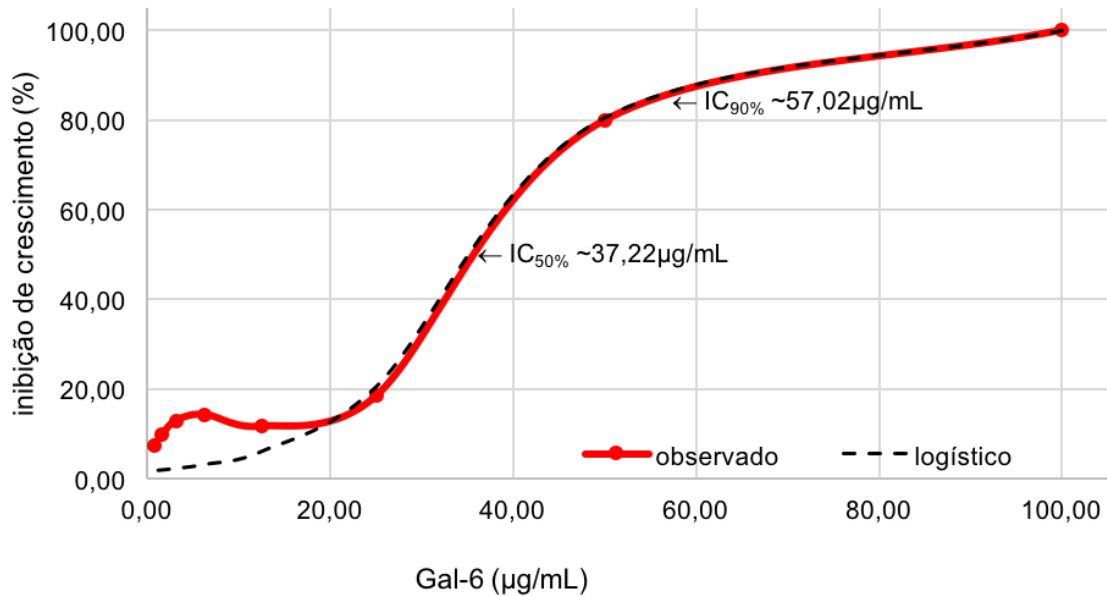


gráfico elaborado com Microsoft Excel para Mac versão 15.30

**Figura 1.9** - Xac com 48h de incubação em meio NYG a 29°C (teste de MBC). Os inóculos foram previamente tratados por 12-14h em meio acrescido de galato de hexila em diferentes concentrações (A a H, colunas 2 a 10:  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  a  $0,78 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ): colunas 1) controle negativo, sem tratamento; 2 a 4) estoque em glicerol; 5 a 7) estoque em etanol; 8 a 10) estoque em DMSO; A e B 11-12) controle positivo (canamicina  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ); C e D 11-12) glicerol 1%; E e F 11-12; G e H 11-12) etanol 1%.

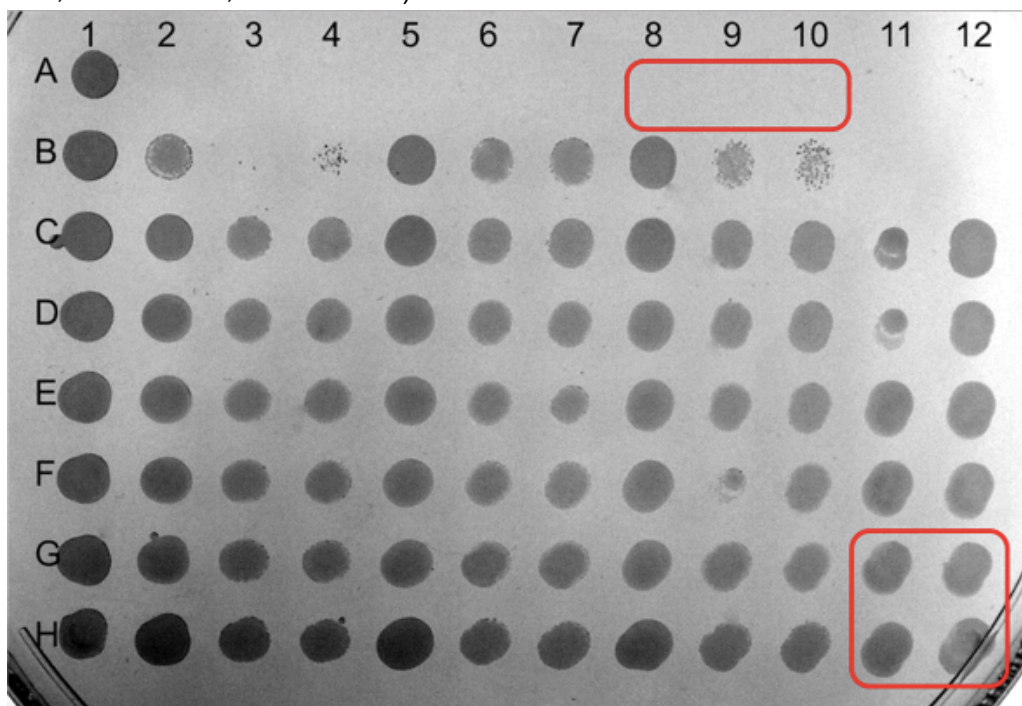


imagem adquirida com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

Para averiguar se a atividade inibitória de galato de hexila sobre Xac seria de natureza bactericida ou bacteriostática, foi realizado teste de MBC, com plaqueamento por replicação de placas de ensaio de REMA.

Tal teste permitiu a confirmação da atividade bactericida do composto: após 48h de incubação a 29°C, notamos a ausência completa de crescimento bacteriano nos tratamentos com galato de hexila a  $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  (Figura 1.9), assim como no controle positivo (canamicina).

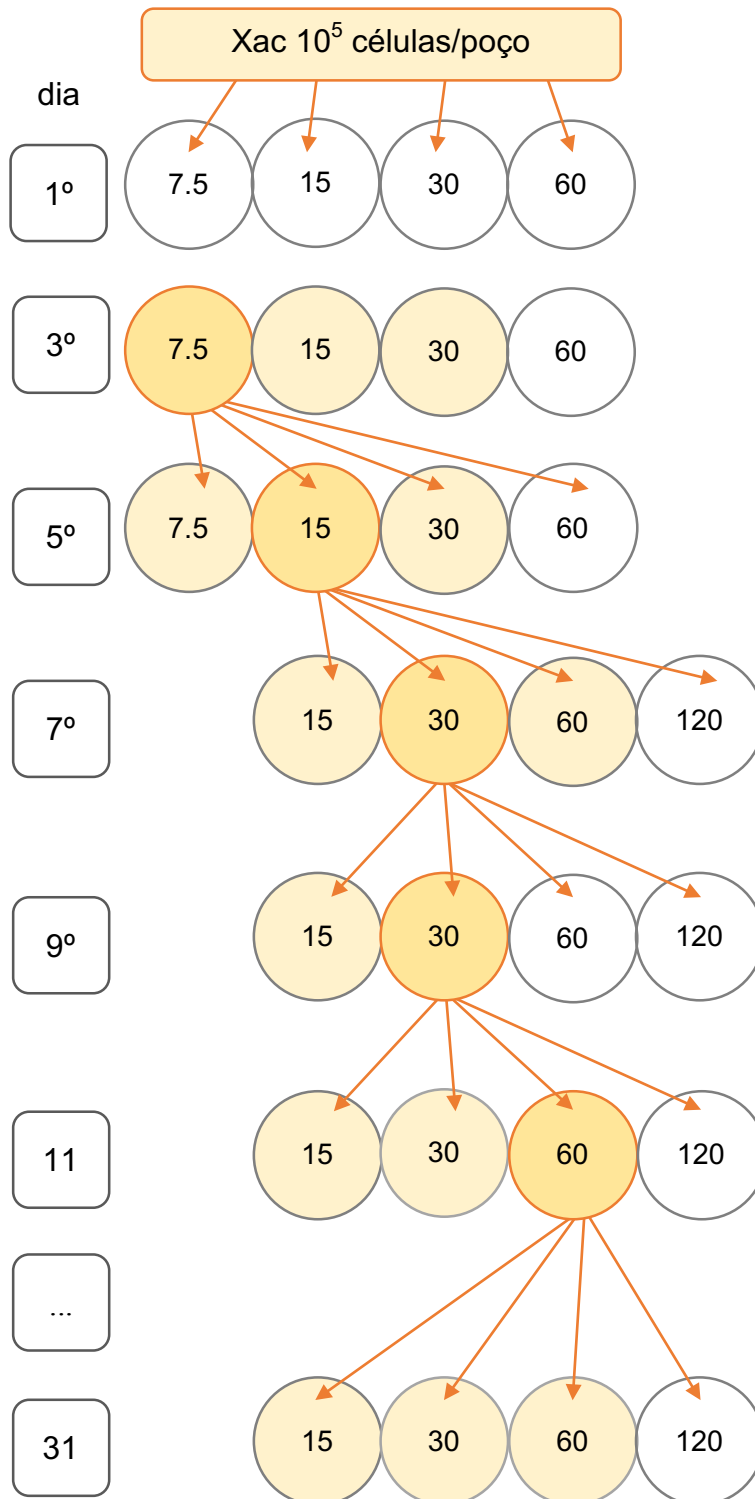
Devido à natureza qualitativa do teste, não é possível verificar o efeito bactericida do composto nas concentrações abaixo de  $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , ainda que seja bastante provável que Gal-6 exerça efeito bactericida sobre parcelas da população bacteriana mesmo em baixas concentrações.

#### **1.4.4 Xac não desenvolveu resistência *in vitro* ao galato de hexila**

Cultivamos Xac em meio NYG líquido acrescido de Gal-6 em concentrações crescentes ao longo de 31 dias para avaliação da capacidade da bactéria em desenvolver resistência ao composto; a cada 48h de incubação os tratamentos foram verificados quanto à presença de crescimento celular (indicado pela turbidez do meio) e reinoculados em meio de cultivo fresco com concentração de Gal-6 igual ou mais alta (Figura 1.10).

Em todas as verificações constatamos a presença de turbidez/crescimento de Xac nas concentrações abaixo de  $\text{IC}_{90\%}$ ; em nenhum momento a bactéria foi capaz de se desenvolver em concentrações acima da  $\text{IC}_{90\%}$ . A ausência de crescimento celular foi confirmada por plaqueamento em meio de cultivo sem adição do composto e incubação a 29°C por 48h; observamos desenvolvimento de colônias em placa somente nos casos em que os inóculos apresentavam turbidez visível.

Como comparação, testamos a capacidade de Xac de crescer na presença de oxiclreto de cobre, utilizando doses até quatro vezes mais altas que sua  $\text{IC}_{90\%}$  ( $\sim 160\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) no meio de cultivo. Verificamos turbidez do meio somente nos cultivos com dose equivalente à  $\text{IC}_{90\%}$  ou inferior, porém após incubação em placa sem adição de cobre, foi possível observar o desenvolvimento de colônias da bactéria mesmo nos tratamentos com as doses mais altas.



esquema elaborado com uso do software Microsoft Word para Mac versão 15.30

**Figura 1.10** - Esquema e resultados do teste de indução branda de resistência em *Xac* frente ao galato de hexila: no 1º dia foram inoculadas cerca de  $10^5$  células de *Xac* por poço contendo meio NYG acrescido de Gal-6 em diferentes concentrações (7,5 - 15 - 30 - 60 ou 120 µg/mL), em volume final de 100µL/poço. Os números dentro dos círculos indicam a concentração de Gal-6 aplicada em cada poço, em µg/mL. Os círculos amarelos claros indicam os poços nos quais o crescimento celular foi confirmado visualmente pela ocorrência de turbidez após 48h de incubação a 29°C. As setas indicam a passagem da bactéria para meio de cultivo fresco contendo Gal-6 e os círculos amarelos com bordas laranja representam os cultivos utilizados como fonte de inóculo nessas passagens. O quadro com reticências entre o 11º e o 31º dia de experimento representa a repetição das respostas de *Xac* às concentrações de Gal-6.



### 1.4.5 Taxa de mutantes naturais resistentes

Utilizamos meio NYG sólido com diferentes concentrações de Gal-6 para verificação do crescimento de Xac e contagem de colônias capazes de sobreviver à dose de composto no meio (taxa de mutantes naturalmente resistentes ao composto); o inóculo consistiu em  $\sim 10^6$  células/tratamento.

Nos tratamentos com 12,5 e  $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de galato de hexila, a incubação por 48h a  $29^\circ\text{C}$  resultou no crescimento de uma camada de colônias coalescentes na superfície do meio, indicando uma taxa de resistência maior que  $1 \cdot 10^{-4}$  (Figura 1.11), enquanto nos tratamentos com 50 e  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  não houve desenvolvimento de colônias.

**Figura 1.11** - Esquema de Xac com 48h de incubação em meio NYG acrescido de Gal-6.



esquema elaborado com uso do software Microsoft Word para Mac versão 15.30

Inferimos, portanto, que em concentrações de  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ou superiores de galato de hexila em meio NYG sólido, a taxa de mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* naturalmente resistentes ao composto é menor que  $1 \cdot 10^{-6}$ .

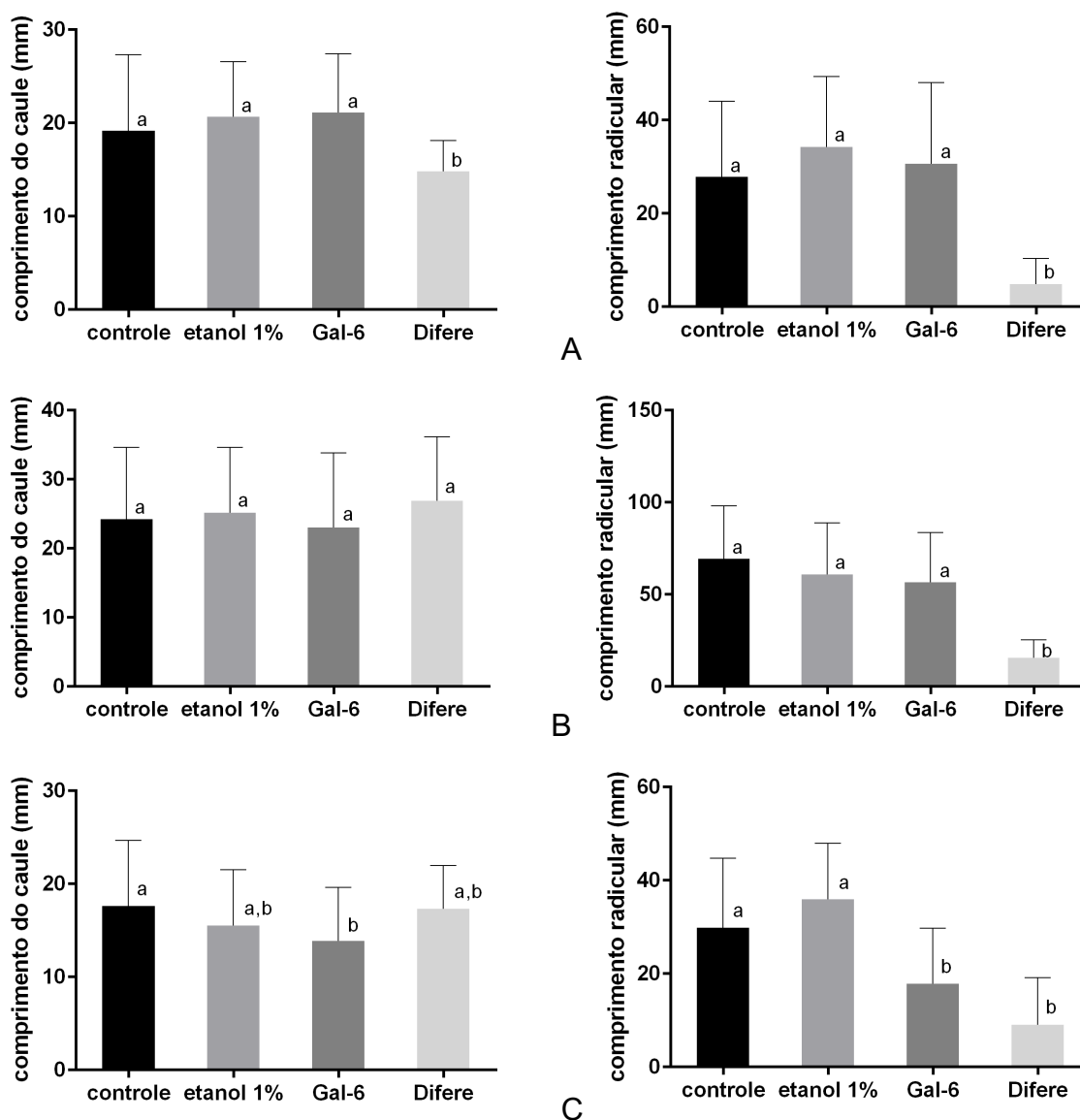
### 1.4.6 A germinação de sementes não foi alterada por Gal-6

Avaliamos a capacidade de germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de rúcula, tomate e alface em presença de galato de hexila, em comparação ao oxiclreto de cobre (controle positivo); a concentração utilizada ( $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) é aproximadamente dez vezes a  $\text{IC}_{90\%}$  de Gal-6 e também a dose de aplicação em campo recomendada para o oxiclreto de cobre. Em todos os tratamentos a taxa de

germinação foi de 100%, porém, observamos variações significativas no desenvolvimento das plântulas.

O desenvolvimento das plântulas de rúcula e tomate não foram alterados significativamente pelo tratamento com Gal-6 (Figura 1.12A e 1.12B), embora as sementes de alface tenham mostrado maior sensibilidade ao composto (Figura 1.12C), com redução de 40% no comprimento médio das radículas 6 dias após tratamento.

**Figura 1.12** - Comprimento médio de caules e radículas de plântulas de (A) rúcula, (B) tomate, e (C) alface, 10, 14 e 6 dias, respectivamente, após tratamento com água de torneira autoclavada (controle); etanol 1%, galato de hexila (Gal-6) ou oxicleto de cobre (Difere); letras diferentes indicam diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Dunn,  $n=50$ .

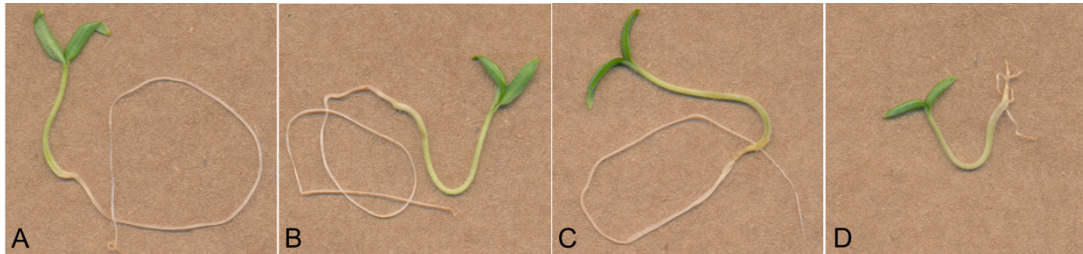


O tratamento com oxiclóreto de cobre provocou redução de aproximadamente 80% no comprimento médio das radículas de rúcula e tomate e 70% em alface. De maneira geral, o comprimento médio dos caules sofreu menores alterações decorrentes dos tratamentos, com redução de cerca de apenas 20% provocada em rúcula pelo oxiclóreto de cobre e em alface por Gal-6.

Enquanto o fenótipo de raízes fasciculadas foi observado em todas as raízes germinadas sob tratamento com oxiclóreto de cobre e algumas das sementes tratadas com galato de hexila, as plântulas de tomate, em especial, foram capazes de desenvolver radículas de comprimento e estrutura morfológica sem alterações sob tratamento com Gal-6 (Figura 1.13).

Gal-6 não provocou o aparecimento de sintomas de fitotoxicidade sobre as folhas aspergidas.

**Figura 1.13** - Plântulas de tomate 14 dias após tratamento com A) água de torneira autoclavada; B) etanol 1%; C) galato de hexila; D) oxiclóreto de cobre.

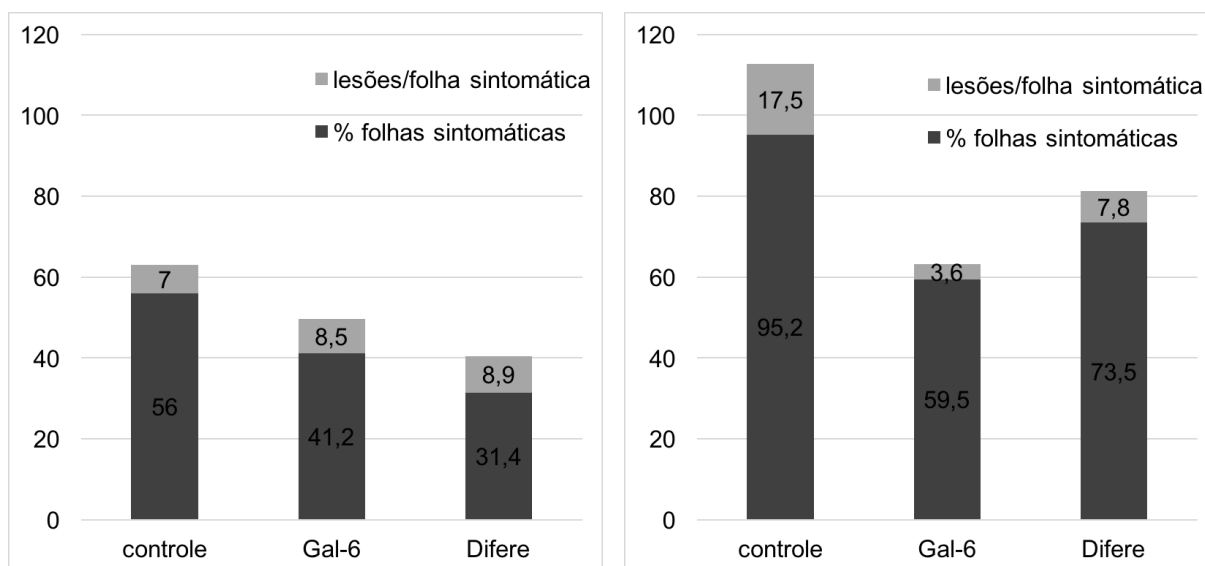


imagens adquiridas com equipamento HP scanjet 2400.

#### 1.4.7 Gal-6 apresentou atividades protetiva e curativa *in planta*

Plantas inoculadas com Xac e tratadas com galato de hexila por aspersão exibiram menor proporção de folhas com sintomas de cancro cítrico, bem como menor número de lesões por folha sintomática, tanto em tratamentos prévios quanto posteriores à inoculação (Figura 1.14).

**Figura 1.14** - Percentual de folhas com sintomas de cancro (cinza escuro) e média do número de lesões por folha sintomática (cinza claro) em testes de aspersão com Gal-6: A) teste preventivo, realizado no verão, utilizando glicerol como solvente; B) teste preventivo, realizado no inverno e C) teste curativo, realizado no inverno, ambos utilizando etanol como solvente. Como controle negativo foi feita aspersão do solvente (controle); como controle positivo foi feita aspersão de oxicloreto de cobre (Difere).



gráficos elaborados com Microsoft Excel para Mac versão 15.30

Em testes preventivos, a quantidade de folhas que apresentaram sintomas foi cerca de 15 a 20% mais baixa sob tratamento com Gal-6 quando comparado ao tratamento controle, valor próximo ao atingido pelo tratamento prévio com oxicloreto de cobre, que reduziu em até 25% (Figura 1.14) o número de folhas sintomáticas. A quantidade de lesões por folha sintomática foi também bastante próxima entre os tratamentos com Gal-6 e oxicloreto de cobre, com diferenças de menos de uma lesão por folha; quando testado em solução em glicerol (Figura 1.15), Gal-6 provocou uma redução no número de lesões por folha sintomática significativamente mais marcante que quando testado em solução em etanol: no primeiro caso houve uma redução de

mais de 80% na média do número de lesões, enquanto no segundo caso não foi observada nenhuma alteração.

**Figura 1.15** - Folhas de laranja 30 dias após inoculação com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. As folhas foram previamente aspergidas com: A) galato de hexila; B) glicerol 1%; C) oxiclreto de cobre.



imagens adquiridas com equipamento HP scanjet 2400.

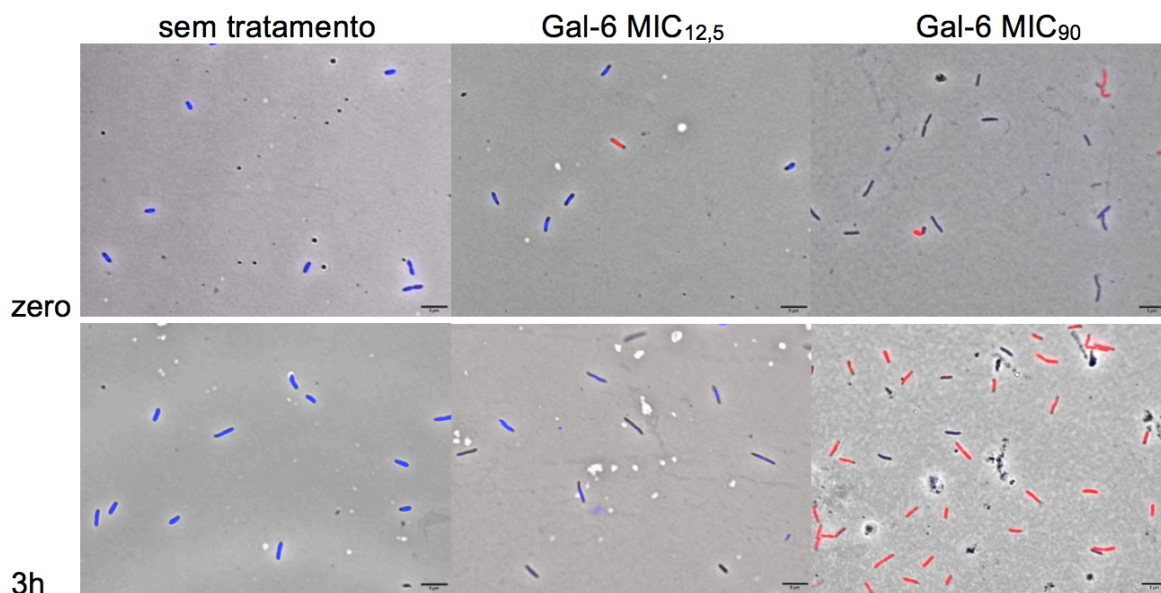
Quando aplicado após a inoculação com Xac, galato de hexila foi capaz de reduzir em cerca de 35% o surgimento de sintomas de cancro cítrico se comparado ao número de folhas sintomáticas no tratamento controle, com 80% menos lesões por folha; sua inibição foi maior que aquela provocada pelo oxiclreto de cobre, que mostrou redução de cerca de 20% no número de folhas com sintomas e 55% na média de lesões.

#### 1.4.8 Gal-6 altera comprimento celular e permeabilidade de membrana

A coloração das células de Xac com os ligantes cromossômicos SYTO-9 e iodeto de propídio (IP) após tratamento com Gal-6 em diferentes concentrações mostrou que o composto é capaz de perturbar a membrana celular da bactéria, levando à sua permeabilização, o que permitiu que o corante IP penetrasse na célula. Em observação ao microscópio (Figura 1.16) foi possível diferenciar células com

membrana íntegra (em azul) ou desestruturada (em vermelho).

**Figura 1.16** - Células de Xac WT com e sem tratamento com galato de hexila coradas com SYTO-9 (em azul, células com membrana íntegra) e iodeto de propídio (em vermelho, células com membrana permeabilizada), observadas ao microscópio em contraste de fase + fluorescência com filtros DAPI e TXRED.



fotos adquiridas e processadas com o software CellSens Dimention 11 (Olympus)

A dose de  $IC_{12,5\%}$  de galato de hexila foi capaz de inibir cerca de 10 a 15% de células desde o momento da aplicação do tratamento (tempo zero), enquanto a dose de  $IC_{90\%}$  provocou morte de aproximadamente 10% das células no momento da aplicação, alcançando a morte de 90% das células de Xac passadas três horas de tratamento.

Após duas horas de tratamento, observamos também a alteração da morfologia celular provocada por Gal-6 em  $IC_{12,5\%}$  e  $IC_{25\%}$ , com alongamento do tamanho celular.

## 1.5 DISCUSSÃO

O ácido gálico é um ácido orgânico produzido naturalmente por plantas como as uvas (*Vitis* spp) (YILMAZ & TOLEDO, 2004) ou o chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) (SHAHRZAD et al, 2001), tradicionalmente utilizadas e reconhecidas por suas propriedades antioxidantes. Os galatos de alquila - ou ésteres de ácido gálico -, por sua vez, são derivados de ácido gálico com atividade antioxidante demonstrada

(KUBO et al, 2010; KIKUZAKI et al, 2002; GUNCKEL et al, 1998) e muitas vezes são sintetizados para uso como aditivos alimentares. Galatos de alquila têm sido relatados também por exercer atividade antimicrobiana contra fungos (ITO, et al, 2014; HSU et al, 2009; LEAL et al, 2009; FUJITA & KUBO, 2002) e bactérias, tanto Gram-positivas (KUBO et al, 2002a, 2004) quanto Gram-negativas (KUBO et al, 2002b), incluindo a bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) (SILVA et al, 2013) e até mesmo atividade antiviral (UOZAKI et al, 2007). A ocorrência natural de muitos destes compostos, aliada a seu uso pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (KOSURU et al, 2018), tornam o potencial antimicrobiano dos galatos de alquila de especial interesse na investigação de compostos para uso na agricultura. Dentre os ésteres de ácido gálico semissintéticos com atividade anti-Xac demonstrada por nosso grupo (KRÓL et al, 2015; SILVA et al, 2013), galato de hexila (Gal-6) destaca-se como um dos mais eficientes.

Há muitas décadas, o controle químico de diversos fitopatógenos de interesse agrícola, incluindo aqueles do gênero *Xanthomonas*, é feito com uso de pulverização de produtos a base de cobre diretamente sobre as plantas (BRUNETTO et al, 2016; BEHLAU et al, 2017; VAN ZWIETEN, 2007; LEITE JR & MOHAN, 1990). O cobre é capaz de catalisar reações bioquímicas em plantas e outros organismos, sendo um elemento essencial à sua sobrevivência e desenvolvimento, quando fornecido em quantidades adequadas. O desequilíbrio nas concentrações de cobre disponíveis no ambiente, entretanto, pode gerar efeitos tóxicos sobre esses mesmos organismos, bem como levar ao desenvolvimento de mecanismos de regulação que permitam a certos organismos sobreviver a este desequilíbrio (BRUNETTO et al, 2016; FONES & PRESTON, 2013; CERVANTES & GUTIERREZ-CORONA, 1994). A aplicação frequente de formulações cúpricas na citricultura como forma de controle do cancro cítrico implica, por um lado, na possibilidade de provocar fitotoxicidade às plantas cultivadas, resultando em perda de qualidade dos frutos e de produtividade das plantas (GOTTWALD et al., 2002; DAS, 2003); por outro lado, implica também na possibilidade de induzir o desenvolvimento de linhagens resistentes de Xac aos compostos utilizados, levando a uma redução na eficiência do controle químico realizado com estes compostos e aumentando assim os custos com o manejo da doença (BEHLAU et al, 2011, 2012). Na investigação de galato de hexila como possível alternativa ao uso do cobre, verificamos que Gal-6 apresenta ação

bactericida *in vitro* contra Xac, sendo que as concentrações inibitórias do composto e curva de comportamento dose-resposta se aproximam daquelas apresentadas por oxiclureto de cobre. Tratamentos preventivos e curativos de plantas jovens de laranja com aspersão de galato de hexila promoveram redução dos sintomas de cancro cítrico, demonstrando seu potencial como alternativa eficiente ao uso de suspensões cúpricas para controle da doença.

Apesar de eficientes na redução dos sintomas do cancro cítrico (TIMMER, 1988; LEITE JR & MOHAN, 1990; GRAHAM, 2004; BEHLAU et al, 2007), compostos cúpricos são tolerados por linhagens de diversas outras espécies que habitam as plantas de citros, inclusive outras *Xanthomonas*, que seriam capazes de eventualmente transmitir seus genes determinantes de resistência ao cobre para Xac por meio de transferência horizontal (BEHLAU et al, 2012, 2013). De fato, a presença de genes de resistência foi constatada em diversas linhagens de Xac provenientes de pomares com aplicações frequentes de cobre (BEHLAU et al, 2013) e linhagens resistentes ao cobre foram identificadas na Argentina (CANTEROS, 1999). Até o momento, não há indicações de que o uso de galato de hexila no controle de Xac possa acarretar no desenvolvimento de linhagens resistentes ao composto. Em nossos experimentos, Xac não foi capaz de demonstrar aquisição de resistência a Gal-6 quando cultivada por várias semanas sob doses sub-letais do composto. Bactericidas cúpricos são capazes também de provocar um estado de inibição de crescimento celular no qual a bactéria permanece viável, ainda que não seja possível cultivá-la; isto ocorreu com cerca de 15% das células tratadas por 10min com uma dose de 135mM de sulfato de cobre, sendo que 1% destas células ainda foram capazes de provocar sintomas de cancro cítrico quando inoculadas por infiltração em folhas de citros (del Campo et al, 2009). Nosso grupo constatou, em estudos anteriores (SILVA et al, 2013), que a inoculação por infiltração de Xac tratada com galato de hexila não resultou no desenvolvimento de quaisquer sintomas ao longo de três semanas de incubação, demonstrando que o tratamento com Gal-6 torna as células de Xac inviáveis e avirulentas.

A ação de galatos de alquila sobre diferentes mecanismos de Xac (KRÓL et al, 2015; SILVA et al, 2013) faz com que o desenvolvimento de linhagens resistentes a Gal-6 seja ainda menos provável. Observamos a redução na densidade óptica máxima atingida pela população e o retardo no desenvolvimento da curva provocados



por Gal-6 sobre o comportamento populacional de Xac, sugerindo que o composto provoca, além de morte celular, perturbação e consequente atraso do processo de divisão bacteriana. Na observação de células de Xac tratadas com galato de hexila em concentração equivalente a  $IC_{90\%}$  fica evidente que o composto atua sobre a estrutura física da bactéria, promovendo permeabilidade na membrana e levando as células à morte. O aumento no comprimento celular observado nas células tratadas com Gal-6 em doses sub letais sugere que o composto atua também sobre processos fisiológicos da bactéria, que acarretam no retardo da divisão celular e consequente inibição de crescimento. O alongamento celular foi relatado anteriormente por nosso grupo em células de Xac tratadas com galatos de alquila (SILVA et al, 2013), sendo interpretado como repressão da divisão e/ou defeito na segregação cromossômica.

Efeitos fitotóxicos do cobre têm sido descritos em diversos organismos (JUANG et al, 2014; LAMB et al, 2012; MICHAUD et al, 2008), incluindo citros (GRAHAM et al, 1985; ALVA et al, 1993) e foi observado em nossos experimentos sobre a germinação de sementes e o desenvolvimento de plântulas de espécies cultivadas como rúcula (*Eruca sativa*), tomate (*Solanum lycopersicum*) e alface (*Lactuca sativa*). Verificamos um menor crescimento das radículas, bem como um aumento no número de raízes laterais em todas as plântulas germinadas sob tratamento com oxicloreto de cobre, o que reduz a capacidade de absorção de água e nutrientes pela planta, podendo provocar sua morte (BRUNETTO et al, 2016). O desenvolvimento de caules e radículas de plântulas de tomate e de rúcula não foi significativamente alterado pelo tratamento com galato de hexila, demonstrando uma menor fitotoxicidade do composto quando comparado ao oxicloreto de cobre. As plântulas de tomate, em especial, foram capazes de se desenvolver com o mesmo vigor que aquelas tratadas somente com água. Estudos de citotoxicidade com galatos de alquila demonstraram seletividade contra células tumorais em ratos (FREY et al, 2007) e atividade quimiopreventiva contra agentes mutagênicos em células humanas; além disso, galato de hexila demonstrou ser não-genotóxico e não-mutagênico, sendo que testes *in vitro* descartam riscos à saúde humana (SILVA et al, 2017).

Por fim, vale ressaltar que galato de hexila apresentou alta solubilidade em etanol, permitindo a formulação de um produto concentrado, facilmente diluído em água e aplicado em plantas por aspersão. Tal característica demonstra a viabilidade do composto dentro da proposta de produto para utilização em campo como uma

alternativa além da pulverização de plantas com oxiclóreto de cobre.

## 1.6 CONCLUSÃO

Galato de hexila mostrou-se um bactericida eficaz contra *Xanthomonas citri* subsp. *citri* tanto *in vitro* quanto *in planta*, com taxas de inibição bacteriana próximas às aquelas apresentadas pelo oxiclóreto de cobre. Gal-6 exibiu também menor fitotoxicidade que oxiclóreto de cobre e baixa probabilidade de indução de resistência em Xac, devido à atuação do composto sobre mecanismos distintos como estrutura de membrana e processos de segregação cromossômica/divisão celular bacteriana.

## REFERÊNCIAS

- ALVA, A.K.; GRAHAM, J.H.; & TUCKER, D.P.H. **Role of calcium in amelioration of copper phytotoxicity for *Citrus***. Soil Science 155(3):211-218. 1993.
- BEHLAU, F.; BELASQUE Jr, J.; BERGAMIN FILHO, A.; LEITE Jr, R.P. **Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento**. Fitopatologia Brasileira 32:311-317. 2007.
- BEHLAU, F.; CANTEROS, B.I.; MINSAVAGE, G.V.; JONES, J.B.; GRAHAM, J.H. **Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfae* subsp. *citrumelonis***. Applied and Environmental Microbiology. 77(12):4089-4096. 2011.
- BEHLAU, F.; SCANDELAI, L.H.M.; SILVA Jr., G.J.; LANZA, F.E. **Soluble and insoluble copper formulations and metallic copper rate for control of citrus canker on sweet orange trees**. Crop Protection. 94:185-191. 2017.
- BEHLAU, F.; HONG, J.C.; JONES, J.B.; GRAHAM, J.H. **Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads**. Phytopathology. 103(5):409-418. 2013.
- BEHLAU, F.; HONG, J.C.; JONES, J.B.; GRAHAM, J.H. **Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated xanthomonads**. Phytopathology. 103(5):409-418. 2013.
- BELASQUE Jr, J.; JESUS Jr, W.C. **Concentração de inóculo e método de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Laranja, 27:263-272, 2006.
- BELASQUE Jr., J.; FERNANDES, N.G.; MASSARI, C.A. **The success of eradication campaign of citrus canker in São Paulo States, Brazil**. Summa

Phytopathol. 35:91–92. 2009.

BOCK., H.C.; GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; COOK, A.Z.; PARKER, P.E. **Wind speed and wind-associated leaf injury affect severity of citrus canker on Swingle citrumelo.** Eur. J. Plant Pathol. 128:21–38. 2010.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 37, de 5 de setembro de 2016.** Diário Oficial da União nº172, Seção 1, pág.1. 2016.

BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. ***Xanthomonas citri*: breaking the surface.** Molecular Plant Pathology. 4(3):141-157.2003.

del CAMPO, R.; RUSSI, P.; MARA, P.; MARA, H.; PEYROU, M.; PONCE de LEÓN, I.; GAGGERO, C. ***Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence.** FEMS Microbiology Letters 298:143-148. 2009.

CANTEROS, B.I. **Copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *citri* plant pathogenic bacteria.** Proceedings of the International Society of Bacteriology, Centre for Advanced Study in Botany. A. Mahadevan. Chennai, India, University of Madras: 455-459. 1999.

CERVANTES, C. & GUTIERREZ-CORONA, F. **Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi.** FEMS Microbiology Reviews 14:121-138. 1994.

DAS, A.K. **Citrus canker - a review.** Journal of Applied Horticulture 5(1):52-60. 2003.

FAO, **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Statistic Database.** 2015. Disponível em <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso em 27 de junho de 2017.

ERENCE, M.C.; GOCHEZ, A.M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J.H.; JONES, J.B. **Recent advances in understanding *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management.** Molecular Plant Pathology. 2017.

FONES, H. & PRESTON, G.M. **The impact of transition metals on bacterial plant disease.** FEMS Microbiology Reviews. 37:495-519. 2013.

FREY, C.; PAVANI, M.; CORDANO, G.; MUÑOZ, S.; RIVERA, E.; MEDINA, J.; MORELLO, A.; MAYA, J.D.; FERREIRA, J. **Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes.** Comparative Biochemistry and Physiology 146:520-527. 2007.

FUJITA, K. & KUBO, I. **Antifungal activity of octyl gallate.** International Journal of Food Microbiology. 79:193-201. 2002.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura. **Guia de fases de desenvolvimento vegetativo da planta de citros.** Disponível em

www.fundecitrus.com.br/comunicacao/download\_manual/25. Acesso em 28 de novembro de 2015.

GRAHAM, J.H. ***Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*. 5(1):1-15. 2004.

GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W.; FARDELMANN, D. **Toxicity of fungicidal copper in soil to Citrus seedlings and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi**. *Disease Control and Pest Management*. 76:66-70. 1985.

GOTTWALD, T.R. & TIMMER, L.W. **The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri***. *Tropical Agriculture*. 72:194-201. 1995.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. **Citrus canker: the pathogen and it's impact**. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. 2002. Disponível em <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/>. Acesso em 24 de março de 2016.

GUNCKEL, S.; SANTANDER, P.; CORDANO, G; FERREIRA, J.; MUÑOZ, S; NUNEZ-VERGARA, L.J.; SQUELLA, J.A. **Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media**. *Chemico-Biological Interactions*. 114:45-59. 1998.

HSU, F.L.; CHEN, P.S.; CHANG, H.T.; CHANG, S.T. **Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi**. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 63:543-547. 2009.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2016. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em 26 de junho de 2017.

ITO, S.; NAKAGAWA, Y.; YAZAWA, S.; SASAKI, Y.; YAJIMA, S. **Antifungal activity of alkyl gallates against plant pathogenic fungi**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 24:1812-1814. 2014.

JUANG, K.W.; LEE, Y.I.; LAI, H.Y.; CHEN, B.C. **Influence of magnesium on copper phytotoxicity to and accumulation and translocation in grapevines**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 104:36-42. 2014.

KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. **Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds**. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50:2161-2168. 2002.

KOSURU, R.Y.; ROY, A.; DAS, S.K.; BERA, S. **Gallic acid and gallates in human health and disease: do mitochondria hold the key to success?** *Molecular Nutrition Food Research*. 62(1). 2018.

KRÓL, E.; DE SOUSA BORGES, A.; DA SILVA, I.; POLAQUINI, C.R.; REGASINI, L.O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D.J. **Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes.** *Frontiers in microbiology* 6: 390. 2015.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K.I. **Anti-MRSA activity of alkyl gallates.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12:113-116. 2002a.

KUBO, I.; FUJITA, K.I.; NIHEI, K.I. **Anti-Salmonella activity of alkyl gallates.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50:6692-6696. 2002b.

KUBO, I.; FUJITA, K.I.; NIHEI, K.I.; NIHEI, A. **Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52:1072-1076. 2004.

KUBO, I.; MASUOKA, N.; HA, T.J.; SHIMIZU, K.; NIHEI, K.I. **Multifunctional antioxidant activities of alkyl gallates.** *The Open Bioactive Compounds Journal*. 3:1-11. 2010.

LAMB, D.T.; NAIDU, R.; MING, H.; MEGHARAJ, M. **Copper phytotoxicity in native and agronomical plant species.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 85:23-29. 2012.

LEAL, P.C.; MASCARELLO, A.; DERITA, M.; ZULJAN, F.; NUNES, R.J.; ZACCHINO, S.; YUNES, R.A. **Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19:1793-1796. 2009.

LEITE Jr, R.P.; MOHAN, S.K. **Integrated plant management of the citrus bacterial caker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil.** *Crop Protection*. 9:3-7. 1990.

MARTINS, P. M. M., LAU, I. F., BACCI JR., M., BELASQUE JR, J., AMARAL, A. M., TABOGA, S. R., FERREIRA, H. **Subcellular localization of proteins labelled with GFP in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: targeting the division septum.** *FEMS Microbiology Letters*, 310:76-83, 2010.

MENEGUIM, L.; RINALDI, D.A.M.F.; SANTOS, A.C.A.; RODRIGUES, L.S.; SILVA, M.R.L.; CANTERI, M.G.; LEITE Jr, R.P. **Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ao cobre e mancozeb.** *Fitopatologia Brasileira*, 32(3), 247-252, 2007.

MICHAUD, A.M.; CHAPPELLAZ, C.; HINSINGER, P. **Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.).** *Plant Soil*, 310,151-165. 2008.

MORAIS, M.C., LUQMAN, S., KONDRATYUK, T.P., PETRONIO, M.S., REGASINI, L.O., SILVA, D.H., BOLZANI, V.S., SOARES, C.P., PEZZUTO, J.M. **Suppression of TNF-alpha induced NFkappaB activity by gallic acid and its semi-synthetic**

**esters**: possible role in cancer chemoprevention. Nat. Prod. Res. 24:1758-1765. 2010.

MORÃO, L. G., POLAQUINI, C.R., SANTOS, M. B., REGASINI, L.O., FERREIRA, H. **Atividade anti-*Xanthomonas citri* subsp *citri* de híbridos moleculares curcumina-cinamaldeído**: uma alternativa para a citricultura. Ciência & Tecnologia: Fatec-JB (Online), v. 8, p. 00-00, n. 2016.

ODA, L. M.; SOARES, B.E.C. **Biotecnologia no brasil**: aceitação pública e desenvolvimento econômico. Parcerias Estratégicas, 10:162-173. 2001.

OLIVEIRA, R. P. de; SOARES FILHO, W. dos S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. da S. **Melhoramento genético de plantas cítricas**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 35(281):22-29. 2014.

OZ, TUGCE, GUVENEK, AYSEGUL, YILDIZ, SADIK, KARABOGA, ENES, TAMER, YUSUF T., MUMCUYAN, NIRVA, OZAN, VEDAT B., SENTURK, GIZEM H., COKOL, MURAT, YEH, PAMELA, TOPRAK, ERDAL. **Strength of Selection Pressure Is an Important Parameter Contributing to the Complexity of Antibiotic Resistance Evolution**. Mol. Biol. Evol. 31(9):2387–2401, 2014.

PALOMINO, J. C., MARTIN, A., CAMACHO, M., GUERRA, H., SWINGS, J., PORTAELS, F. **Resazurin microtiter assay plate**: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 46(8): 2720- 2722. 2002.

SANCHES, A.L.R. *et al.* **Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo**. Rev. Econ. Sociol. Rural, Brasília, v.52, n.3, p.549-566, 2014.

SÃO PAULO. **Resolução SAA-10, de 20 de fevereiro de 2017**. Delimita e oficializa todo o território do Estado de São Paulo como área sob Sistema de Mitigação de Risco, relativo à praga do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e institui procedimentos fitossanitários. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 21/02/2017.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; ATROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. **Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. com. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp.nov.nom. rev.comb.nov.; *X. campestris* pv *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X campestris* pv *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov.** Syst. Applied Microbiology 28(6):494-518. 2005.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; ATROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. **Emended classification**

**of xanthomonad pathogens on citrus.** Syst. Applied Microbiology 29(8):690-695. 2006.

SHAHRZAD, S.; AOYAGI, K.; WINTER, A.; KOYAMA, A.; BITSCH, I.  
**Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans.** Human Nutrition and Metabolism Research Communication. (2001):1207-1210. 2001.

SILVA, I.C.; REGASINI, L.O.; PETRÔNIO, M.S.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; BELASQUE Jr, J.; SACRAMENTO, L.V.S.; FERREIRA, H. **Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** J Bacteriol. 195(1): 85–94. 2013.

SILVA, I. C. FERREIRA, H. **Drug sensitivity assay of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using REMA plate method.** Bio-Protocol, 3(16):861-864. 2013.

TIMMER, L.W. **Evaluation of bactericides for control of citrus canker in Argentina.** Proc. Fla. State Hort. Soc. 101:6-9. 1988.

UOZAKI, M.; YAMASAKI, H.; KATSUYAMA, Y.; HIGUCHI, M.; HIGUTI, T.; KOYAMA, A.H. **Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses.** Antiviral Research. 73:85-91. 2007.

VARGAS, R.G.; GONÇALVES-ZULIANI, A.M.O.; CROCE FILHO, J.; CARVALHO, S.A.; NOCCHI, P.T.R.; NUNES, W.M.C. **Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na região Noroeste Paranaense, em condições de campo.** Summa phytopathol. Botucatu, 39(4):235-241. 2013.

XIMENES, V.F., LOPES, M.G., PETRONIO, M.S., REGASINI, L.O., SILVA, D.H., da FONSECA, L.M. **Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride(AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes.** Journal of Agriculture and Food Chemistry. 58:5355-5362. 2010.

YANG, L.; HU, C.; LI, N.; ZHANG, J.; YAN, J.; DENG, Z. **Transformation of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] with pthA-nls for acquiring resistance to citrus canker disease.** Plant Molecular Biology. 75:11-23. 2011.

YILMAZ, Y. & TOLEDO, R.T. **Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid.** Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52:255-260. 2004.

## **CAPÍTULO II: O galato de hexila atua sobre a patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* por meio da perturbação do segregossomo?**

### **Resumo**

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é o patógeno causador do cancro cítrico, uma das doenças que afeta a produtividade da citricultura, atividade de grande importância econômica para o Brasil. Recentemente foi proposta a utilização de galatos de alquila como método de controle do cancro cítrico. Entre estes compostos, galato de hexila destacou-se como um eficiente bactericida contra Xac, atuando sobre a permeabilidade da membrana e, possivelmente, sobre o processo de segregação cromossômica/divisão celular. Avaliamos o efeito da depleção ou do excesso da proteína ParB, envolvida no processo de segregação cromossômica, sobre a patogenicidade de Xac, como maneira de investigar um possível modo de ação do composto galato de hexila sobre a patogenicidade de Xac. A comparação do crescimento populacional ao longo do tempo entre linhagens mutantes com deleção de ParB e selvagem mostrou que a perturbação de ParB altera o comportamento populacional de Xac, prolongando seu tempo de duplicação. Com uso de western blot, verificamos que a produção de ParB induzida por arabinose nos mutantes tem início gradual e que, enquanto o mutante *Xac*  $\Delta parB$  *amy*::pLAL6 produz a proteína ParB somente sob indução, *Xac*  $\Delta parB$ /pLAC2 apresenta vazamentos quando não-induzida ou mesmo quando inibida com glicose. Da mesma maneira, *Xac*  $\Delta parB$  *amy*::pLAL6 não produz transcritos de *parB* (verificado por RT-PCR) quando inibida. Em observações ao microscópio, notamos que a morfologia do mutante *Xac*  $\Delta parB$  *amy*::pLAL6 se mostrou alterada em comparação à linhagem selvagem, tanto em condição de depleção como de excesso de ParB, resultando em um tamanho mais alongado. A motilidade *in vitro* de Xac foi reduzida em condição de excesso de ParB. Não houve perda de patogenicidade como consequência da depleção da proteína. As linhagens mutantes exibiram morfologia e comportamento semelhantes àqueles observados em Xac WT sob influência de galato de hexila, corroborando a hipótese de perturbação do mecanismo de segregação cromossômica/divisão celular pelo composto. ParB, entretanto, mostrou ser uma proteína não essencial em Xac e a perturbação de seu funcionamento, por si só, não foi capaz de promover a perda de patogenicidade em Xac.

palavras-chave: cancro cítrico, segregação cromossômica, proteína ParB

### **Abstract**

The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is the pathogen that causes citrus canker disease, one of the pathogens affecting citrus productivity, an activity of great



economic importance for Brazil. It was recently proposed the use of alkyl gallates as a method of bacterial control against citrus canker. Amongst these compounds, hexyl gallate has been shown to be an efficient bactericide against *Xac*, acting on membrane permeability and possibly on the process of chromosomal segregation/cell division. As a way of investigating a possible mode of action of hexyl gallate on *Xac* pathogenicity, we evaluated whether depletion or excess of ParB (a protein involved in the chromosomal segregation process) would promote loss of pathogenicity in the bacteria. Comparison of population growth over time between ParB deleted mutants and wild strain showed that ParB disturbance alters the *Xac* population behavior, prolonging its doubling time. With use of western blot, we verified that the production of ParB induced by arabinose in the mutants has gradual onset and that while the mutant *Xac* $\Delta$ parBamy::pLAL6 produces ParB protein only under induction, *Xac* $\Delta$ parB/pLAC2 presents leaks when not induced or even when inhibited with glucose. Likewise, *Xac* $\Delta$ parBamy::pLAL6 does not produce parB transcripts (as verified by RT-PCR) when inhibited. In observations under the microscope, we noted that the morphology of *Xac* $\Delta$ parBamy::pLAL6 has been altered in comparison to the wild strain, both in depletion condition and in excess of ParB, resulting in a more elongated cell size. *Xac in vitro* motility was reduced under ParB excess. Protein depletion did not lead to pathogenicity loss. The morphology and behavior exhibited by the mutants were similar to those observed in *Xac* WT under the influence of hexyl gallate, corroborating the hypothesis that the compound disturbs chromosomal segregation/cell division. ParB, however, has shown to be a non-essential protein in *Xac* and disruption of its functioning alone was not capable of promoting pathogenicity loss in *Xac*.

key words: citrus canker, chromosome segregation, ParB protein

## 2.1 INTRODUÇÃO

A citricultura é uma atividade de grande importância econômica para o Brasil, maior produtor mundial de laranjas e líder em exportações de suco concentrado (FAO, 2015). Como toda atividade agrícola, a produtividade e lucratividade do cultivo de

citros estão sujeitas a fatores bióticos e ambientais que interferem com as práticas culturais. A bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), causadora do cancro cítrico, é capaz de infectar todas as variedades comerciais de citros (GOTTWALD et al., 2002; DAS, 2003), acarretando em prejuízos na produtividade devido à queda de frutos, restrições na aceitação dos frutos para consumo, limitações no transporte e comércio de frutos provenientes de áreas infectadas e altos gastos com o controle da doença (SANCHES et al., 2014; del CAMPO et al., 2009). Dentre as práticas de manejo mais utilizadas para controle da doença está a aplicação frequente de bactericidas cúpricos (BEHLAU et al., 2017), resultando no acúmulo do metal no solo, gerando grandes riscos ambientais. Compostos naturais ou semissintéticos têm sido avaliados quanto a seu potencial antimicrobiano contra Xac como alternativos ao cobre. Galato de hexila demonstrou atividade bactericida contra o patógeno (KRÓL et al., 2015; SILVA et al., 2013), tornando necessária a elucidação de seus mecanismos de ação para maior entendimento de seu potencial e viabilidade para uso na agricultura.

Recentemente nosso grupo demonstrou que galatos de alquila teriam a capacidade de perturbar processos de segregação e/ou divisão celular em Xac ao observar a descontinuação do complexo ParB-GFP/DNA ocorrida em células submetidas a tais compostos, incluindo o galato de hexila (SILVA et al., 2013). Tal observação, somada ao fato de que em bactérias como *C. crescentus* e *M. tuberculosis* (MIERZEWSKA & BURDZY, 2012) a ausência de ParB leva a morte celular, evidencia a importância de se aprofundar o conhecimento acerca da estrutura e funcionamento da célula de Xac, na busca por subsídios necessários à identificação de possíveis alvos no combate ao cancro cítrico.

As bactérias do gênero *Xanthomonas*, assim como cerca de 70% das espécies conhecidas e estudadas (LIVNY, 2007), tem seu processo de segregação cromossômica coordenado pelo sistema de partição *parABS* (ou sistema homólogo a este, no caso de determinados gêneros). Este sistema é responsável por organizar a segregação cromossômica e de alguns plasmídeos durante a divisão celular: proteínas ParB ligam-se ao DNA no sítio *parS*, normalmente localizado próximo à origem de replicação das moléculas, e são guiadas por proteínas ParA (com atividade ATPásica estimulada por ParB) para os polos, assegurando assim que cromossomos e plasmídios duplicados sejam destinados de maneira equitativa às células-filhas

(BADRINARAYANAN *et al.*, 2015).

No intuito de verificar a possibilidade de que a ação do composto galato de hexila observada sobre a patogenicidade de Xac se desse através da perturbação do segrossomo, foram realizadas diversas tentativas de se gerar uma linhagem mutante que não expressasse a proteína ParB. O efeito deletério das mutações de deleção realizadas, porém, impossibilitava a sobrevivência da bactéria e, como alternativa, foram utilizadas estratégias de disrupção (UCCI *et al*, 2014) e depleção com uso de plasmídio replicativo (LACERDA, 2015).

Ucci *et al* (2014), por meio de experimentos de infiltração de células mutantes expressando formas alteradas da proteína ParB em folhas de *C. limonia* Osbeck, demonstraram que a disrupção de *parB* foi capaz de inibir a patogenicidade de Xac. O uso de plasmídio replicativo por Lacerda (2015) não foi capaz de inibir completamente a expressão de ParB, porém, a interferência na expressão da proteína provocou alterações celulares presumivelmente decorrentes de deficiência na segregação cromossômica, como a redução da taxa de crescimento celular, aumento do tamanho celular médio, do número de células anucleadas e aberrações celulares.

Finalmente, a depleção de ParB por meio da inserção de plasmídio integrativo com o promotor induzível arabinose (sem vazamentos) (LACERDA, 2017) permitiu a observação e comparação entre células de Xac com e sem a proteína ParB, com o mínimo de interferência do sistema de depleção.

## 2.2 OBJETIVOS

Avaliar se a depleção ou o excesso da proteína ParB promoveriam perda da patogenicidade em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, como maneira de investigar um possível modo de ação do composto galato de hexila sobre a patogenicidade de Xac.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

Utilizamos a linhagem selvagem 306 - (sequenciada por Silva *et al.*, 2002) da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac WT) e os mutantes Xac  $\Delta parB/pLAC1$ , Xac  $\Delta parB/pLAC2$  e Xac  $\Delta parB amy::pLAL6$  construídos por Lacerda (2015), por meio

de deleção de *parB* cromossômico e introdução de plasmídeo replicativo (pLAC1 e pLAC2) ou integrativo (pLAL6) contendo *parB* controlado pelo promotor induzível por arabinose *para*. Os mutantes *Xac*  $\Delta$ *parB*/pLAC2 e *Xac*  $\Delta$ *parB amy::*pLAL6, expressam a proteína ParB contendo o peptídeo TAP em sua porção C-terminal (ParB-TAP). Para o preparo dos pré-inóculos, as linhagens de *Xac* foram incubadas em BOD a 29°C em meio NYG (nitrogen-yeast-glycerol: 5g · L<sup>-1</sup> peptona, 3g · L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 2% glicerol) com ou sem ágar (15g · L<sup>-1</sup>), acrescidos de glicose (2%) ou arabinose (0,05%) quando necessário. As curvas de crescimento foram construídas com leituras de DO<sub>600</sub> a cada 30min ao longo de 15h em leitor de microplacas Synergy H1 (Biotek): foram utilizadas placas multiwell de 24 poços com 1,5mL de inóculo/poço com DO<sub>600</sub> inicial de 0,1. As placas foram incubadas a 29°C sob agitação constante e, passadas 3h de incubação, os inóculos foram acrescidos de glicose (G) ou arabinose (A), de acordo com a condição desejada (repressão ou indução de *parB*, respectivamente).

### 2.3.2 Análise da ação indutora da arabinose

Para analisar a ação indutora da arabinose, foram coletadas alíquotas de células dos mutantes *Xac*  $\Delta$ *parB*/pLAC2 e *Xac*  $\Delta$ *parB amy::*pLAL6 durante uma curva de crescimento em 30min, 1h, 2h e 4h após a adição do açúcar indutor. As proteínas totais extraídas foram quantificadas com uso do DC Protein Assay kit (Bio-Rad) e as amostras foram padronizadas para ~0,7mg de proteínas por mL; foram introduzidos ~3µg de proteínas por amostra em géis de acrilamida 12%. Após cada eletroforese SDS-PAGE, um gel foi submetido à eletroforese de transferência, ligando as proteínas a uma membrana de nitrocelulose Hybond P (Amersham Biosciences), que foi então tratada para o procedimento de western blot de acordo com as instruções do kit Westar Nova 2011 (Cyanagen) e do manual Antibodies Protocol Guide (Clontech): a) a membrana foi bloqueada a 4°C overnight em tampão com proteínas do leite, b) incubada por 1h a temperatura ambiente com anticorpo HRP-conjugated Anti Horse IgG (Sigma-Aldrich A6917) com afinidade por TAP, diluído na proporção 1:2500, c) tratada por 1min com substrato quimioluminescente contendo luminol + peróxido (Cyanagen) com afinidade pelo anticorpo e, d) a quimioluminescência do anticorpo ligado a TAP (por sua vez, ligado a ParB e à membrana) foi detectada por meio de revelação de filme para quimioluminescência Hyperfilm ECL (Amersham), com uso de soluções reveladora e fixadora (Sigma-Aldrich P7042 e P7167).

### 2.3.3 Análise de presença da proteína ParB por western blot

Foram coletadas alíquotas de células das linhagens *Xac*  $\Delta parB/pLAC2$  e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  a cada 3h ao longo de curvas de crescimento de 15h sob condições de não-indução, indução e repressão do promotor. Para verificação da presença de proteína ParB nas amostras coletadas, seguimos os protocolos descritos em 2.3.2: as proteínas celulares foram extraídas, quantificadas, padronizadas, submetidas às eletroforeses SDS-PAGE e de transferência e por fim, a detecção da fusão proteica ParB-TAP foi realizada por western blot e revelação de reação de quimioluminescência.

### 2.3.4 Análise de presença de transcritos *parB* por RT-PCR

Para verificação da presença de transcritos de *parB* do mutante *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  em condições de não-indução (U), indução (A) e repressão (G) do promotor *para*, coletamos amostras de cultivo celular no início da fase de crescimento exponencial ( $DO_{600} \sim 0,4$ ), das quais extraímos RNA com uso do kit RNeasy (Qiagen). As amostras foram tratadas com DNaseI, termocicladas com primer ParBR para síntese da primeira fita de cDNA e termocicladas novamente para amplificação de *parB* com os primers ParBF e ParBR.

### 2.3.5 Morfologia celular

Para observação de fenótipo celular e verificação de eventuais alterações morfológicas, foram coletadas amostras das linhagens *Xac* WT e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  em fase de crescimento exponencial ( $DO_{600} \sim 0,4$ ), provenientes de cultivos em condições de não-indução, indução ou repressão do promotor *para*. As amostras foram coradas com o ligante cromossômico SYTO9 de acordo com instruções do kit de viabilidade celular Live/Dead BacLight (Molecular Probes L7007) e imobilizadas em lâminas cobertas com agarose 0,9% (MARTINS et al., 2010) para observação. Todas as observações foram feitas em microscópio Olympus BX-61 equipado com câmera monocromática Orca-Flash 2.8 (Hamamatsu) e filtros DAPI/FITC e TXRED e a captura e processamento das imagens realizado com uso do software Cell Sens Dimension versão 11 (Olympus).

### 2.3.6 Avaliação da motilidade

A motilidade das linhagens *Xac* WT, *Xac*  $\Delta parB/pLAC1$ , *Xac*  $\Delta parB/pLAC2$  e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  foi avaliada pela medida do halo de crescimento de cada colônia com 24h, 36h, 48h e 72h de incubação. Para tanto, foram inoculados 3 $\mu$ L de cada inóculo com DO<sub>600</sub>~0,3 em placas com meio NYGB (5g · L<sup>-1</sup> peptona, 3g · L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 2% glicerol, 2,5g · L<sup>-1</sup> ágar), acrescido de glicose ou arabinose, de acordo com a condição desejada.

### 2.3.7 Avaliação de patogenicidade do mutante *in planta*

Os testes *in planta* foram realizados em plantas com brotações jovens de laranja doce (*Citrus sinensis*) doadas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira (IAC). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, construída com recursos FAPESP (processo 2013/14013-7). Os testes de patogenicidade foram realizados nos meses de junho-julho de 2016.

Foram feitos cultivos de *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  em meio NYG e o inóculo preparado por ajuste de DO<sub>600</sub>~0,4 (BELASQUE Jr & JESUS Jr, 2006), descarte do meio de cultivo e ressuspensão das células em NaCl 0,85%. Foram inoculados cerca de 20-30mL da suspensão por planta; o controle negativo foi feito com aspersão de 20mL de solução de NaCl 0,85%. As plantas foram mantidas em câmaras úmidas (sacos plásticos) por 24h a fim de manter o ambiente ideal para que ocorresse infecção por *Xac* e observadas ao longo de 60 dias para verificação da manifestação de sintomas do cancro cítrico que indicassem a presença ou ausência de patogenicidade.

### 2.3.8 Análises estatísticas

As curvas de crescimento foram construídas por regressão não-linear suavizada (LOWESS) com uso do software Graphpad Prism 6; a coleta de dados foi realizada em triplicata. Os experimentos de Western blot e RT-PCR tiveram avaliação qualitativa (presença/ausência de bandas) e foram realizados em duplicatas. Os resultados dos testes de motilidade foram avaliados por meio de ANOVA de duas vias seguida de teste post hoc de Sidak, com uso do software Graphpad Prism 6; os experimentos foram realizados em triplicata. O comprimento celular registrado nas fotomicrografias foi calculado pelo software Cell Sens Dimension versão 11 (Olympus). A avaliação da patogenicidade foi também qualitativa (presença/ausência de sintomas); o teste foi

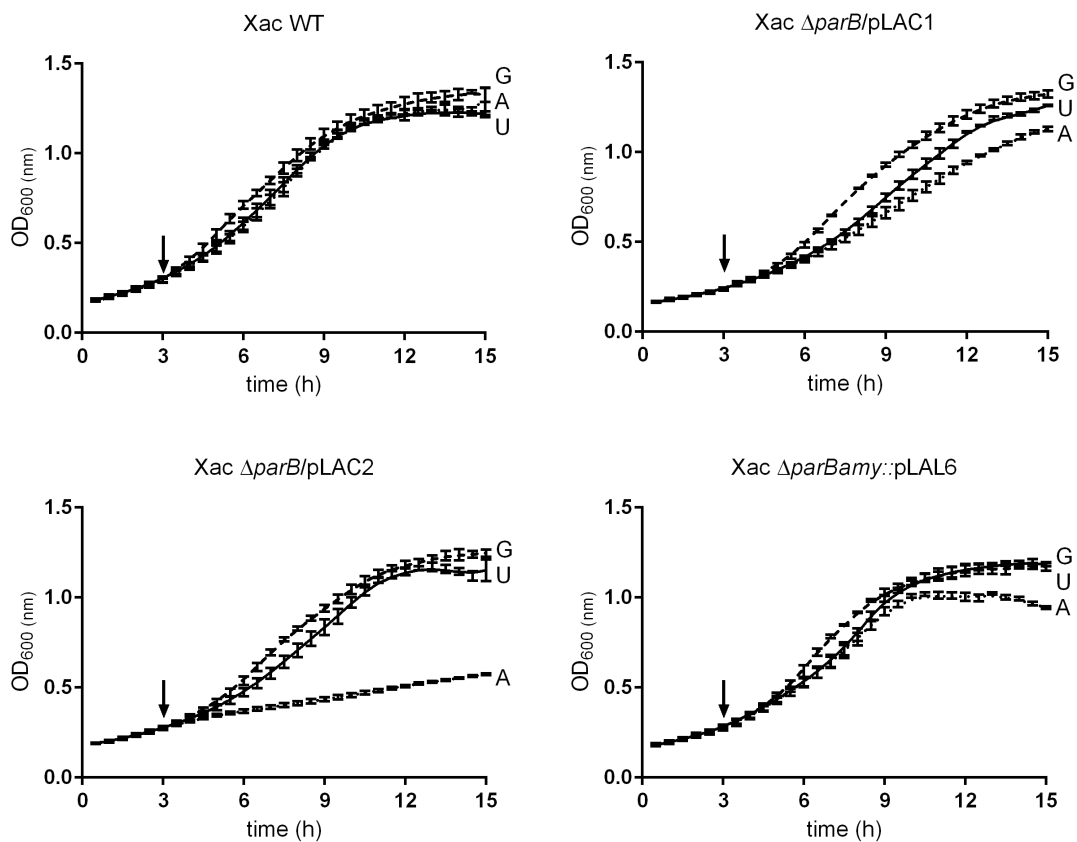
realizado em duplicata.

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 A perturbação de ParB altera o comportamento populacional de Xac

Com o intuito de avaliar a influência da perturbação de ParB no comportamento de Xac ao longo do tempo, registamos o crescimento populacional de Xac (linhagens selvagem e mutantes) ao longo de 15h em condições de indução, não-indução e inibição do promotor *para*, com medidas de densidade óptica a cada 30 minutos.

**Figura 2.1** - Curvas de crescimento populacional de Xac WT, Xac  $\Delta parB/pLAC1$ , Xac  $\Delta parB/pLAC2$  e Xac  $\Delta parB amy::pLAL6$ , em condições de indução (A), não-indução (U) ou inibição (G) do promotor *para*. A seta indica o momento em que os açúcares foram adicionados aos cultivos (3h).



gráficos elaborados com Graphpad Prism 6 (adaptado de LACERDA et al, 2017)

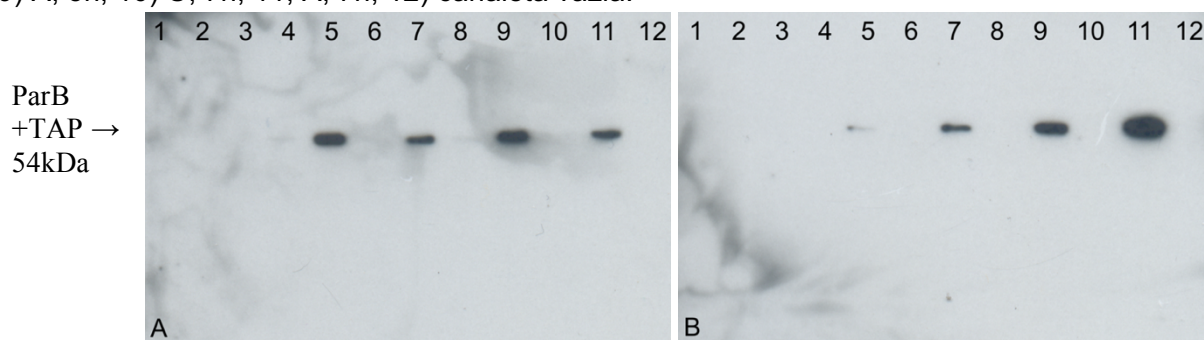
Comparando o comportamento populacional de Xac WT, Xac  $\Delta parB/pLAC1$ , Xac

$\Delta parB/pLAC2$  e  $Xac \Delta parB amy::pLAL6$  em condições de indução por arabinose (A), não-indução (U) e inibição por glicose (G) (Figura 2.1), pudemos observar que, de maneira geral: a) o tratamento com glicose gera leve aumento no crescimento populacional; b) as linhagens mutantes apresentam crescimento moderadamente mais lento comparado à linhagem selvagem; c) o tratamento com arabinose provoca queda no crescimento populacional das linhagens mutantes, não interferindo no crescimento da linhagem selvagem.

#### 2.4.2 A indução por arabinose se inicia gradualmente

Para verificar o efeito indutor de arabinose sobre o promotor *para*, comparamos amostras induzidas e não induzidas dos mutantes  $Xac \Delta parB/pLAC2$  e  $Xac \Delta parB amy::pLAL6$ , verificando a presença ou ausência de bandas de ParB-TAP com o uso de western blot.

**Figura 2.2** - Bandas de ParB-TAP expresso por  $Xac \Delta parB/pLAC2$  (A) e  $Xac \Delta parB amy::pLAL6$  (B) reveladas em filme de quimioluminescência por western blot. Arabinose foi adicionada ao cultivo 3h após o início da incubação: 1) mistura de amostras de duas populações sem tratamento (U), em incubação por 3h, partindo de  $DO_{600} \sim 0,1$ ; 2 e 3) marcadores de peso molecular Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder e Fermentas Life Sciences Unstained Protein Molecular Weight Marke - as bandas correspondem a ParB-TAP  $\sim 54kDa$ ; 4) população não tratada, com 3:30h de incubação; 5) população induzida com arabinose (A) com 3:30h de incubação; 6) U, 4h; 7) A, 4h; 8) U, 5h; 9) A, 5h; 10) U, 7h; 11, A, 7h; 12) canaleta vazia.



imagens adquiridas com equipamento HP scanjet 2400 (adaptado de LACERDA et al, 2017)

As bandas de ParB-TAP detectadas por western blot evidenciam o efeito indutor da arabinose sobre o promotor *para* e a expressão da fusão proteica resultante desta condição. A indução desencadeada pela arabinose é evidente no mutante  $Xac \Delta parB/pLAC2$  já nos primeiros 30 minutos de tratamento com o açúcar indutor,



apresentando oscilações ao longo do período observado (até 4h em condição de indução); notamos também uma leve oscilação na intensidade da banda de ParB-TAP, possivelmente associada ao efeito tóxico provocado pela fusão (ver Figura 2.2). Para o mutante *Xac ΔparB amy::pLAL6*, essa indução ocorre gradualmente, mostrando-se ainda pouco evidente na primeira hora e intensificando-se ao longo da duração do tratamento.

Cabe ressaltar que foram também detectadas bandas de ParB-TAP produzidas pelo mutante *Xac ΔparB/pLAC2* em condição de não-indução (canaletas 4 e 8, Figura 2.2), revelando o vazamento do promotor nesta linhagem. O mesmo não ocorreu com o mutante *Xac ΔparB amy::pLAL6*.

#### **2.4.3 *Xac ΔparB amy::pLAL6* produz a proteína ParB somente sob indução**

Para demonstrar a efetividade do promotor *para* quando não induzido ou quando inibido por glicose, verificamos também a presença ou ausência de bandas de ParB-TAP por western blot em amostras dos mutantes *Xac ΔparB/pLAC2* e *Xac ΔparB amy::pLAL6* coletadas a cada 3h ao longo de uma curva de crescimento populacional, por um período de 15h.

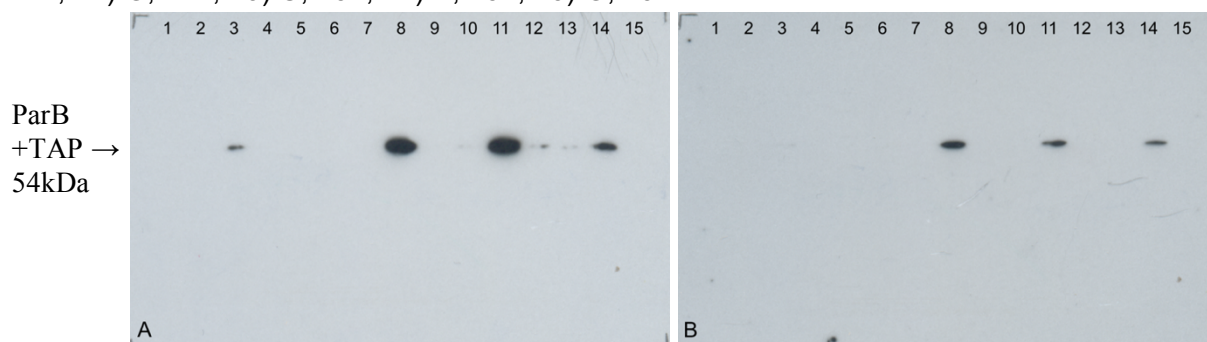
Todas as amostras coletadas após adição de arabinose mostraram presença da fusão proteica (canaletas 3, 8, 11 e 14), embora a resposta apresentada tenha variado entre as linhagens, concordando com o observado nos testes de verificação de indução de *para* por arabinose (ver item 2.4.2): no início da curva, a expressão de ParB-TAP foi mais rápida e intensa em *Xac ΔparB/pLAC2* que em *Xac ΔparB amy::pLAL6* (Figura 2.3A e 2.3B, canaletas 3), com maior acúmulo de ParB-TAP no final da fase de crescimento exponencial/início da fase de crescimento estacionário (canaletas 8 e 11) e atenuação da banda no início da fase de morte (canaletas 14).

Em *Xac ΔparB/pLAC2*, não foi possível observar a presença de bandas de ParB-TAP até 9h de incubação em ausência de indutor/inibidor, (Figura 2.3A, canaletas 1, 2 e 7), porém estas foram visíveis nas amostras coletadas com 12h e 15h de crescimento (canaletas 10 e 13), evidenciando a ocorrência de vazamento do promotor integrado em pLAC2 (replicativo) em ausência de indução. Além disto, a inibição de *para* por glicose não se mostrou completamente eficiente em *Xac ΔparB/pLAC2*, com a presença de banda de ParB-TAP nas amostras coletadas 9h

após tratamento com glicose (canaleta 12).

O controle de inibição do promotor *para* integrado no plasmídio pLAL6 da linhagem *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  foi inteiramente eficiente, sem a presença de bandas de ParB-TAP detectáveis nas amostras não induzidas (Figura 2.3B, canaletas 1, 2, 7, 10 e 13) ou inibidas (canaletas 4, 9, 12 e 15).

**Figura 2.3** - Bandas de ParB-TAP expresso por *Xac*  $\Delta parB/pLAC2$  (A) e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  (B) reveladas em filme de quimioluminescência por western blot. Arabinose e glicose foram adicionadas às respectivas populações após 3h de incubação: 1) mistura de amostras de três populações sem tratamento (U), em incubação por 3h, partindo de  $DO_{600} \sim 0,1$ ; 2) população não tratada com 6h de incubação; 3) população induzida com arabinose (A) com 6h de incubação; 4) população inibida com glicose (G) com 6h de incubação; 5 e 6) marcadores de peso molecular Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder e Fermentas Life Sciences Unstained Protein Molecular Weight Marke - as bandas correspondem a ParB-TAP  $\sim 54kDa$ ; 7) U, 9h; 8) A, 9h; 9) G, 9h; 10) U, 12h; 11) A, 12h; 12) G, 12h; 13) U, 15h; 14) A, 15h; 15) G, 15h.



imagens adquiridas com equipamento HP scanjet 2400 (adaptado de LACERDA et al, 2017)

#### 2.4.4 *Xac* $\Delta parB amy::pLAL6$ não produz transcritos de *parB* quando inibida

Com uso da técnica de RT-PCR, averiguamos se a ausência de bandas de ParB-TAP observada em 2.4.2 e 2.4.3 poderia ser explicada pela interrupção da produção de transcritos de *parB* pelo mutante *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  em ausência de indução do promotor *para*.

Confirmamos a presença de transcritos de *parB* nas amostras em que as células foram induzidas com arabinose (Figura 2.4, canaleta 14) e a ausência dos mesmos naquelas que haviam sido inibidas com glicose (canaleta 15); observamos também a presença de uma pequena quantidade de transcritos de *parB* no material extraído de populações não induzidas.

**Figura 2.4** - PCR diagnóstico para verificação da presença de *parB* em amostras de *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  não tratada (U), induzida (A) ou inibida (G). Produto da extração de RNA: 4) U; 5) A; 6) G. Após tratamento com DNase: 8) U; 9) A; 10) G. Após síntese da primeira fita de cDNA: 13) U; 14) A; 15) G. 1 e 16) canaletas vazias; 3, 7 e 12) *Xac* WT (controle positivo); 2) controle negativo (branco); 11) marcador de peso molecular Thermo GeneRuler 1kb DNA Ladder - as bandas correspondem a *parB* ~0,9kb.

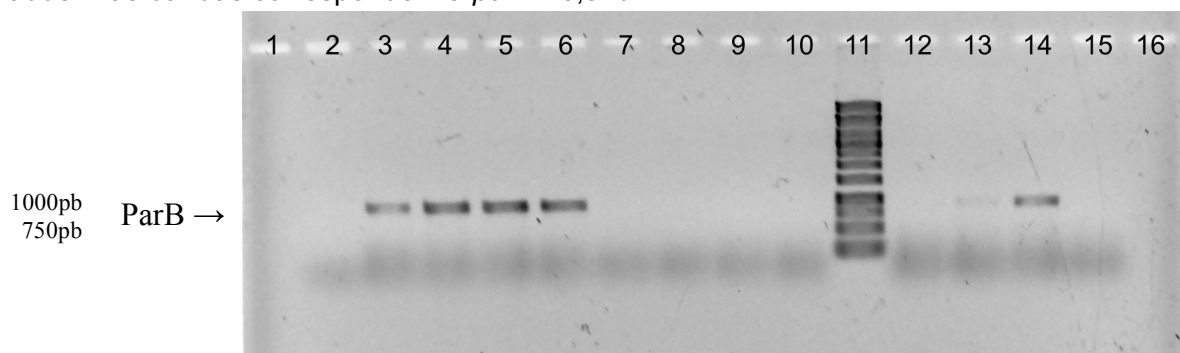


imagem adquirida com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

### 2.4.5 Morfologia e viabilidade celular

Em observações ao microscópio, notamos que o mutante *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  apresenta morfologia alterada quando comparado à linhagem *Xac* WT, com células mais alongadas que a linhagem selvagem (Tabela 1, Figura 2.5), tanto em condições de depleção de ParB quanto de excesso da proteína. Quando não induzidas - condição de depleção de ParB -, as células de *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  se mostraram aproximadamente 47% mais compridas que as da linhagem WT, enquanto em presença de arabinose e de glicose, as células eram, respectivamente, cerca de 35% e 26% mais longas que as de *Xac* WT.

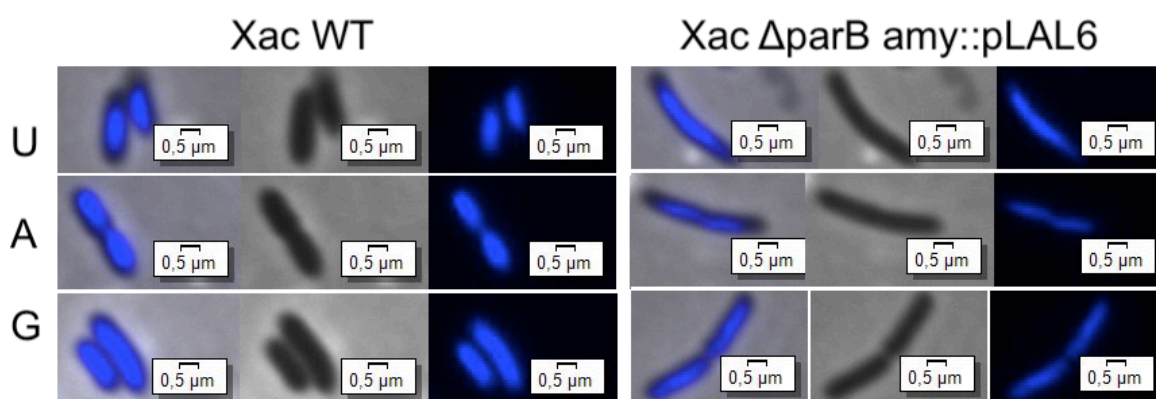
**Tabela 1:** Comprimento celular médio de células de *Xac* WT e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  observadas em microscopia de contraste de fase.

	comprimento celular médio* ( $\mu\text{m}$ ) $\pm \sigma$	
	<b><i>Xac</i> WT</b>	<b><i>Xac</i> <math>\Delta parB amy::pLAL6</math></b>
U	1.65 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>
A	1.71 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.32 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>
G	1.85 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	2.34 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>

\*n = 100, a  $\neq$  b ( $p < 0,05$  - Tukey); U = NYG; A = NYG + arabinose 0,05%; G = NYG + glicose 2% (adaptado de LACERDA et al, 2017)

Embora não tenham sido reconhecidos sinais evidentes de aberrações na distribuição dos nucleoides, o mutante *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  apresentou cerca de três vezes mais (0,6%) células anucleadas que a linhagem selvagem (0,2%) em todos os tratamentos.

**Figura 2.5** - Células de *Xac* WT e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  coradas com SYTO-9; não-tratadas (U), induzidas (A) ou inibidas (G) na sequência: contraste de fase + fluorescência com filtro DAPI - contraste de fase - fluorescência com filtro DAPI.



fotos adquiridas e processadas com o software CellSens Dimention 11 (Olympus)  
(adaptado de LACERDA et al, 2017)

#### 2.4.6 O excesso de ParB reduziu a motilidade *in vitro* de *Xac*

Com o objetivo de investigar se a perturbação na expressão de ParB provocaria alterações sobre a motilidade de *Xac* e, conseqüentemente, sua capacidade de colonização de citros, a motilidade dos mutantes *Xac*  $\Delta parB/pLAC1$ , *Xac*  $\Delta parB/pLAC2$  e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  e da linhagem selvagem *Xac* WT foi avaliada pela comparação do crescimento médio do diâmetro das colônias em meio NYGB, acrescido ou não de arabinose ou de glicose.

Observamos que o acréscimo de arabinose ao meio de cultivo não provocou alterações sobre o crescimento médio do diâmetro das colônias da linhagem selvagem *Xac* WT, enquanto reduziu significativamente o espalhamento das colônias de *Xac*  $\Delta parB/pLAC1$ , *Xac*  $\Delta parB/pLAC2$  e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  (Figuras 2.6 e 2.7): após 48h de incubação em ausência de indução, todas as linhagens apresentavam crescimento médio das colônias semelhante (aproximadamente 6mm), exceto por *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$ , que apresentou menor espalhamento; com 48h de incubação sob indução com arabinose, a média de crescimento da linhagem selvagem manteve-se

inalterada, enquanto *Xac*  $\Delta parB/pLAC1$  e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  mostraram espalhamento reduzido em pouco mais de 80% e, por fim, as colônias de *Xac*  $\Delta parB/pLAC2$  não foram capazes de se desenvolver.

**Figura 2.6** - Crescimento médio\* do diâmetro de colônias de *Xac* WT, *Xac*  $\Delta parB/pLAC1$ , *Xac*  $\Delta parB/pLAC2$  e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  cultivadas por 48h em meio NYGB com (induced) ou sem arabinose (untreated). \*n=4; colunas com mesma letra não diferem significativamente (p<0,05 teste de Sidak).

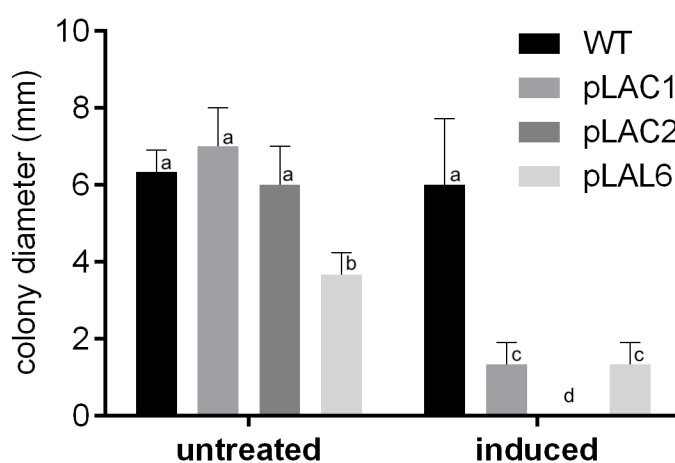


gráfico elaborado com Graphpad Prism 6

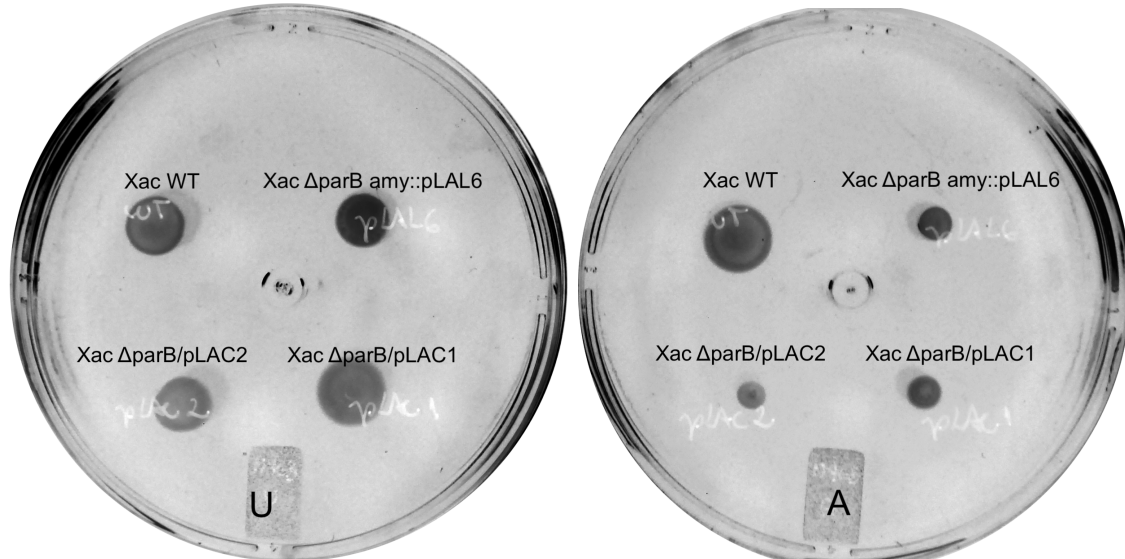
O tratamento com glicose provocou o rápido aglutinamento de colônias (menos de 24h), inviabilizando a avaliação de sua influência sobre a motilidade das linhagens.

#### 2.4.7 A patogenicidade de *Xac* não é alterada pela depleção de ParB

Utilizamos então o mutante *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  para avaliar a capacidade de colonização de citros e a patogenicidade de *Xac* em ausência da proteína ParB. Como demonstrado, este mutante não expressa a proteína em condições de ausência de indução. As plantas aspergidas com o mutante *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  desenvolveram sintomas iniciais de cancro cítrico como manchas cloróticas eruptivas aproximadamente três semanas após inoculação, mesmo momento que aquelas aspergidas com *Xac* WT (controle positivo); sinais de necrose tornaram-se evidentes ao longo das semanas subsequentes, ambas mostrando grau de incidência similar (ver Figura 2.8). As plantas aspergidas com solução de NaCl 0,85% (controle

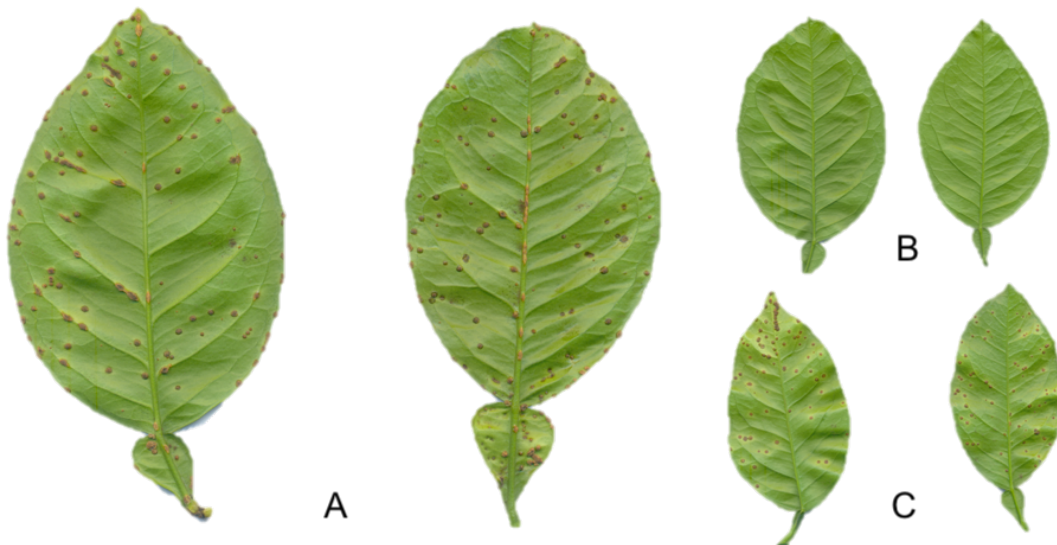
negativo) não exibiram sintomas.

**Figura 2.7** - Colônias de *Xac* WT, *Xac*  $\Delta parB/pLAC1$ , *Xac*  $\Delta parB/pLAC2$  e *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$  cultivadas por 48h em meio NYGB com (A) ou sem (U) arabinose.



imagens adquiridas com o software Camera Control Pro 2 (Nikon)

**Figura 2.8** - Folhas de *C. sinensis* 60 dias após inoculação por aspersão de *Xac*: A) folhas aspergidas com *Xac*  $\Delta parB amy::pLAL6$ ; B) controle negativo, sem *Xac*; C) controle positivo, com *Xac* WT.



imagens adquiridas com equipamento HP scanjet 2400

## 2.5 DISCUSSÃO

O tratamento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com galato de hexila promove sintomas característicos da desestruturação de processos de segregação cromossômica/divisão celular bacteriana e resulta em perda de patogenicidade. O papel da proteína ParB - que atua no processo de segregação cromossômica - sobre a patogenicidade de Xac foi investigado na tentativa de elucidar o mecanismo de ação do composto. Para tanto, foi utilizado um mutante com deleção de *parB* e inserção do gene em plasmídio com promotor induzível por arabinose integrado no cromossomo.

Nas curvas populacionais, o aumento de crescimento populacional observado no tratamento com glicose, ao que tudo indica, se deve ao aporte nutricional proporcionado pela adição do açúcar e, ainda que não seja possível observar uma redução na DO<sub>600</sub> máxima atingida, devemos considerar eventuais interferências dos efeitos nutricionais sobre a resposta à inibição de ParB. O leve aumento observado no tempo de duplicação das linhagens mutantes quando não-induzidas, por sua vez, indica que a depleção de ParB altera o processo de segregação cromossômica e conseqüentemente, de divisão celular, sem provocar morte em Xac. O excesso da proteína ParB e, em especial, da fusão ParB-TAP, justifica a queda de crescimento populacional observada em condição de indução por arabinose. Nos mutantes Xac  $\Delta parB/pLAC1$  e Xac  $\Delta parB/pLAC2$ , o alto número de cópias do plasmídio replicativo pode gerar um excesso significativo da proteína, cujos efeitos são agravados em Xac  $\Delta parB/pLAC2$  pela presença do peptídeo TAP; em Xac  $\Delta parB amy::pLAL6$ , ainda que em cópia única, ParB-TAP pode ser superexpresso devido à continuidade da indução do promotor *para* submetido à presença do açúcar.

A produção de ParB pelo mutante Xac  $\Delta parB/pLAC2$  em resposta à presença de arabinose no meio de cultivo foi inicialmente mais elevada que a de Xac  $\Delta parB amy::pLAL6$  em virtude do alto número de cópias de *parB* nesta linhagem, enquanto seu comportamento oscilatório, em oposição à resposta gradual de Xac  $\Delta parB amy::pLAL6$ , pode ser explicado pelo efeito deletério provocado pelo produto da indução.

O caráter replicativo e número de cópias de pLAC2 explicam também o vazamento do produto ParB-TAP em Xac  $\Delta parB/pLAC2$ , enquanto o mutante Xac  $\Delta parB amy::pLAL6$ , com cópia única de *parB* integrada no cromossomo bacteriano, exibe maior controle sobre sua expressão.



A presença de transcritos de *parB* em amostras de *Xac ΔparB amy::pLAL6* quando não induzida pode indicar que, além da inibição da transcrição de *parB*, o mutante poderia apresentar disfunção na tradução da proteína, resultando na ausência de ParB observada nos testes de western blot; por outro lado, é possível que, mesmo quando não induzida, *Xac ΔparB amy::pLAL6* produza uma quantidade da proteína indetectável pelo método. A ausência de banda de ParB-TAP nas amostras da linhagem selvagem sugere que a produção da proteína não ocorre constantemente em *Xac* e sim em momentos específicos; devemos considerar, porém, a possibilidade de falhas na execução do método, bem como de presença de quantidades não detectadas da proteína.

O fenótipo alongado das células de *Xac ΔparB amy::pLAL6* evidencia o atraso na segregação/separação dos cromossomos, resultando no retardamento da divisão celular, observado também ao longo do crescimento populacional, em decorrência do desequilíbrio de ParB. Esse mesmo fenótipo foi observado em células tratadas com galato de hexila em doses sub letais, originando a hipótese de que a ação inibitória do composto sobre *Xac* deveria-se à perturbação do mecanismo de segregação cromossômica/divisão celular.

É possível que a redução na motilidade apresentada pelas linhagens mutantes quando em presença de arabinose deva-se a um desequilíbrio provocado pelo acúmulo de ParB nas células, gerado pela expressão constante da proteína em decorrência da indução de *para*, em oposição a uma possível expressão descontínua sob controle do promotor nativo na linhagem selvagem.

Anteriormente, a fim de verificar se a depleção ou a ausência de ParB promoveriam perda da patogenicidade em *Xac*, utilizamos os mutantes *Xac ΔparB/pLAC1* e *Xac ΔparB/pLAC2* em presença e ausência de inibição (CAVALCA, 2016). Observamos o desenvolvimento de sintomas de cancro cítrico em todas as linhagens e tratamentos, concluindo que não haveria perda de patogenicidade ou virulência em ausência/depleção de ParB. Ao demonstrarmos, porém, que em *Xac ΔparB/pLAC2* o controle do promotor não era completamente efetivo, com produção da proteína mesmo em condição de inibição, fez-se necessária a verificação de nossa conclusão inicial, dado que a condição de ausência ou de depleção de ParB não era garantida. Ao testarmos o mutante *Xac ΔparB amy::pLAL6* confirmamos, portanto, que a ausência de ParB, isoladamente, não leva à perda de patogenicidade de *Xac*.



## 2.6 CONCLUSÃO

As linhagens mutantes com deleção de *parB* exibiram morfologia e comportamento característicos da perturbação da segregação cromossômica/divisão celular (como células alongadas e retardo no crescimento populacional) semelhantes àqueles observados em Xac WT sob influência de galato de hexila, corroborando a hipótese de perturbação de tais mecanismos pelo composto como um de seus mecanismos de atuação. ParB, entretanto, mostrou ser uma proteína não essencial em Xac e a perturbação de seu funcionamento, por si só, não é capaz de promover a perda de patogenicidade da bactéria.

## REFERÊNCIAS

- BADRINARAYANAN, A.; LE, T.B.; LAUB, M.T. **Bacterial chromosome organization and segregation**. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2015. 31:171–99, 2015.
- BRUNINGS, A.M.; GABRIEL, D.W. **Xanthomonas citri: breaking the surface**. Molecular Plant Pathology. 4(3):141-157.2003.
- del CAMPO, R.; RUSSI, P.; MARA, P.; MARA, H.; PEYROU, M.; PONCE de LEÓN, I.; GAGGERO, C. **Xanthomonas axonopodis pv. citri enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence**. FEMS Microbiology Letters 298:143-148. 2009.
- DAS, A.K. **Citrus canker - a review**. Journal of Applied Horticulture 5(1):52-60. 2003.
- CAVALCA, L.B. **Capacidade de formação de biofilme, motilidade e patogenicidade de uma linhagem mutante da bactéria Xanthomonas citri subsp. citri** / Lúcia Bonci Cavalca. - Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro Orientador: Henrique Ferreira. Rio Claro, 2016.
- FAO, **Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Statistic Database**. 2015. Disponível em <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso em 27 de junho de 2017.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. **Citrus canker: the pathogen and it's impact**. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. 2002. Disponível em <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/>. Acesso em 24 de março de 2016.

KRÓL, E.; DE SOUSA BORGES, A.; DA SILVA, I.; POLAQUINI, C.R.; REGASINI, L.O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D.J. **Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes.** *Frontiers in microbiology* 6: 390. 2015.

LACERDA, L.A. **Sistema para depleção de proteínas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** 2015. 54 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015.

LACERDA, L.A.; CAVALCA, L.B.; MARTINS, P.M.M.; GOVONE, S.J.; BACCHI JR, M.; FERREIRA, H. **Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** *Plasmid*, 90:44-52, 2017.

LIVNY, J.; YAMAICHI, Y.; WALDOR, M. K. **Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria: insights from comparative genomics.** *Journal Bacteriology*, 189(23):8693- 8703, 2007.

MARTINS, P.M.M., LAU, I.F., BACCI JR., M., BELASQUE JR, J., AMARAL, A.M., TABOGA, S.R., FERREIRA, H. **Subcellular localization of proteins labelled with GFP in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: targeting the division septum.** *FEMS Microbiology Letters*, 310:76-83, 2010.

MIERZEWSKA, J.; BURDZY, G. **Prokaryotic ParA–ParB–parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle.** *Elsevier*, 67(1):1-14, 2012.

SANCHES, A.L.R. *et al.* **Análise econômica da prevenção e controle do cancro cístico no estado de São Paulo.** *Rev. Econ. Sociol. Rural*, Brasília, 52(3):549-566, 2014.

SILVA, I.C.; REGASINI, L.O.; PETRÔNIO, M.S.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; BELASQUE Jr, J.; SACRAMENTO, L.V.S.; FERREIRA, H. **Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** *J Bacteriol.* 195(1):85-94. 2013.

UCCI, A. P.; MARTINS, P.M.M.; LAU, I.F.; BACCI Jr, M.; BELASQUE Jr, J.; FERREIRA, H. **Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** *MicrobiologyOpen*. 3(1):29-41, 2014.

## Anexo: Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Plasmid 90 (2017) 44–52



Contents lists available at ScienceDirect

Plasmid

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yplas](http://www.elsevier.com/locate/yplas)

### Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*



Lilian A. Lacerda<sup>a,1</sup>, Lucia B. Cavalca<sup>a,1</sup>, Paula M.M. Martins<sup>b</sup>, José S. Govone<sup>c</sup>,  
Maurício Bacci Jr.<sup>d</sup>, Henrique Ferreira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Depto. Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Citricultura Sylvio Moreira, Rodovia Anhangüera, km 158, Caixa Postal 04, Cordeirópolis, SP 13490-970, Brazil

<sup>c</sup> Depto. de Estatística, Matemática Aplicada e Computação, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Estudos de Insetos Sociais, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Av. 24A, 1515, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Citrus canker  
Chromosome segregation  
Bacterial gene knockout

#### ABSTRACT

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) is a plant pathogen and the etiological agent of citrus canker, a severe disease that affects all the commercially important citrus varieties, and has worldwide distribution. Citrus canker cannot be healed, and the best method known to control the spread of *X. citri* in the orchards is the eradication of symptomatic and asymptomatic plants in the field. However, in the state of São Paulo, Brazil, the main orange producing area in the world, control is evolving to an integrated management system (IMS) in which growers have to use less susceptible plants, windshields to prevent bacterial spread out and sprays of cupric bactericidal formulations. Our group has recently proposed alternative methods to control citrus canker, which are based on the use of chemical compounds able to disrupt vital cellular processes of *X. citri*. An important step in this approach is the genetic and biochemical characterization of genes/proteins that are the possible targets to be perturbed, a task not always simple when the gene/protein under investigation is essential for the organism. Here, we describe vectors carrying the arabinose promoter that enable controllable protein expression in *X. citri*. These vectors were used as complementation tools for the clean deletion of *parB* in *X. citri*, a widespread and conserved gene involved in the essential process of bacterial chromosome segregation. Overexpression or depletion of ParB led to increased cell size, which is probably a resultant of delayed chromosome segregation with subsequent retard of cell division. However, ParB is not essential in *X. citri*, and in its absence the bacterium was fully competent to colonize the host citrus and cause disease. The arabinose expression vectors described here are valuable tools for protein expression, and especially, to assist in the deletion of essential genes in *X. citri*.

#### 1. Introduction

The Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* is the causal agent of citrus canker, a severe disease that affects all the commercially important citrus plants all over the world (Brunings & Gabriel, 2003; Gottwald et al., 2002). The most effective preventive measure known to control the spread of *X. citri* within and among orchards is the eradication of infected plants, along with the elimination of asymptomatic trees that may be potential sources of inocula in the surroundings. This was the practice in the state of São Paulo, one of the biggest orange producers, from 1999 to 2009 (Belasque Jr. et al., 2009). However, changes in legislation starting from 2010 relaxed the control measures and citrus canker has increased

enormously, resulting directly in losses in the orange producing market (FUNDECITRUS).

Due to its economic importance, *X. citri* had its genome sequenced in early 2000 (da Silva et al., 2002) unveiling the structure of one main chromosome of ~5 Mb and two rather large plasmids, pXAC33 and pXAC64, with 33 and 64 kb, respectively. Genome annotation showed that *X. citri* carries homologues of the *parAB* genes in the chromosome, which are involved in replicon partitioning in bacteria (Gerdes et al., 2010; Leonard et al., 2005). Among the forces that act on bacterial chromosome segregation, ParB is part of an active partitioning system involved in the organization of the bacterial centromere (Badrinarayanan et al., 2015; Pinho et al., 2013). ParB binds specifically to *parS* sites organized around the origin of replication of bacterial

\* Corresponding author.

E-mail address: [henrique.ferreira@linacre.oxon.org](mailto:henrique.ferreira@linacre.oxon.org) (H. Ferreira).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.03.005>

Received 17 February 2017; Received in revised form 20 March 2017; Accepted 23 March 2017

Available online 24 March 2017

0147-619X/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

chromosomes (Lin and Grossman, 1998; Livny et al., 2007). In addition to specific binding to *parS*, ParB also engages in a second mode of DNA interaction known as spreading, in which it uses *parS* as a nucleation point to form large nucleoprotein complexes (Murray et al., 2006). Following spreading, inter-complex bridging (the interaction among ParB/DNA complexes), and the recruitment of condensin have been suggested to act on the organization of the centromeric region for efficient chromosome segregation (Graham et al., 2014; Gruber & Errington, 2009). In some bacterial models (*Caulobacter crescentus* and *Vibrio cholera*), the ParB partner ParA has been directly implicated in origin/chromosome partitioning (Fogel and Waldor, 2006; Ptacin et al., 2010). Some segregation models, namely the diffusion-ratchet mechanism and DNA-relay mechanism (Hwang et al., 2013; Lim et al., 2014; Vecchiarelli et al., 2013), suggest that ParA, which is an ATPase and a molecular switch controlled by the ATP/ADP bound state (Leonard et al., 2005), would bind DNA nonspecifically in the form of ParA-ATP. The ParA-ATP/DNA nucleoprotein complex probably grows from the bacterial pole to which the centromere has to be oriented. Next, ParB bound to *parS* interacts with ParA-ATP and stimulates its ATPase activity, which leads to ParA/DNA dissociation and ParB/*parS* movement towards a ParA-ATP gradient, resulting in centromere segregation.

In *X. citri*, *parB* is also involved in chromosome segregation (Ucci et al., 2014). The lack of a normal ParB function in *X. citri* led to chromosome segregation defects, an increase in the number of anucleated cells, cell filamentation and an unexpected phenotype of loss of pathogenicity, which could be associated with the impairment of cell motility (Bartosik et al., 2009; Donovan et al., 2010; Ireton et al., 1994; Mohl et al., 2001). These observations were obtained by expressing truncated forms of ParB in *X. citri*, since previously we were unable to delete the *parB* gene from it (Ucci et al., 2014). Considering that essential genes are often characterized by protein depletion in many organisms, we decided to apply this technique to study *parB* in *X. citri*. However, the first obstacle to be overcome was the need for a protein expression vector carrying a tight/controllable promoter in *X. citri*.

Here, we describe the construction of two new protein expression vectors for *X. citri*, one replicative and another integrative, both based on the arabinose promoter of the pBAD series (Guzman et al., 1995). Our vectors were used to express ParB *in trans* in *X. citri*, which enabled us to obtain a clean deletion of *parB* in this plant pathogen. Fine modulation of ParB expression was achieved by using the arabinose promoter in *X. citri*, and that was explored for the characterization of the ParB function in this bacterium. Finally, we conclude that ParB is not essential in *X. citri*, and in its absence the bacterium is still able to colonize citrus and induce citrus canker symptoms.

## 2. Material and methods

### 2.1. Bacterial strains and growth conditions

The strains used in the present work are listed in Table 1. The wild-type *Xanthomonas citri* subsp. *citri* used was the sequenced strain 306 (da Silva et al., 2002; Schaad et al., 2006; Schaad et al., 2005). *X. citri* was cultivated in NYG/NYG-agar medium (Peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L and glycerol 20 g/L) at 30 °C, supplemented with D-Glucose (2%), L-Arabinose (0,05%) and Sucrose (3%) for the knockouts. For the cloning steps we used *E. coli* DH10B (Invitrogen), cultivated in LB/LB-agar at 37 °C (Sambrook et al., 1989). The antibiotics kanamycin, gentamicin and ampicillin were used at 20 µg/mL. Growth curves: wild type *X. citri* and mutants were cultivated in NYG for 14 h; next, cultures were diluted in fresh NYG medium to an O.D.600 nm of ~0.1 and a final volume of 1.5 mL. Cell cultures were distributed in wells of a 24-wells microtiter plate and incubated in a Synergy H1 (BioTek) at 30 °C with constant agitation and O.D.600 nm measures every 30 min. Plots of the growth curves were prepared using the software Graphpad Prism 6.

### 2.2. Plasmids

The strategy used to construct the arabinose protein expression system for *X. citri* was essentially the one described by Sukchawalit et al. (1999), who ligated the Arabinose repressor/promoter cassette from the pBAD vector series (Guzman et al., 1995) into the backbone of a broad host range plasmid from the pBBR-MCS series (Kovach et al., 1995). Here, the cassette containing the arabinose repressor/promoter (pBAD), the *acp* gene of *E. coli* and the TAP1479 coding DNA (*araC-para-acp-tap1479*) was extracted by PCR from pEB304 (Gully et al., 2003) using the primers pARAF2/pARAR2 (Supplementary Table 1). The PCR product was ligated into pBBR1-MCS5 digested with *HindIII*/*SmaI*, giving rise to pLAL1 (Fig. 1). The replicative ParB expression vectors pLAC1 and pLAC2 were constructed by replacing the *acp* gene of pLAL1 with *X. citri parB*. The *parB* gene was PCR amplified from pAPU1 (Ucci et al., 2014) using the primer pairs ParBF20140220/ParBR20140220 or ParBF20140220/TAP1479-20140220, digested with *HindIII*/*EcoRI*, and ligated to pLAL1/*HindIII*/*EcoRI*, giving rise to pLAC1 and pLAC2, respectively (Fig. 1). To construct pLAL6, we first digested pGCD21 with *BglII*/*ScaI* in order to remove the markers for kanamycin and Ampicillin resistance. Next, we isolated the gentamicin coding DNA by PCR from pBBR1-MCS5 with primers 201410GmF/201409GmR, digested it with *BamHI*, and ligated the product into pGCD21/*BglII*/*ScaI*, which gave rise to pGCD21-Gm (Fig. 1). Finally, *parB-tap1479* was isolated by PCR using pLAC2 as a template and the primers ParBF20141013/TAP1479-20141013. Then, *gfp* was removed from pGCD21-Gm using *XhoI*/*XbaI*, and replaced by the *parB-tap1479* cassette digested with the same enzymes, generating pLAL6 (Fig. 1). To construct the deletion plasmid pLAL7, two DNA fragments of approximately 1000 bp each (DNA1 and DNA2, corresponding to the genomic coordinates 4590802..4591785 and 4592668..4593677, respectively; da Silva et al. (2002)) were isolated by PCR from the *X. citri* genome using the primer pairs Delta-*parBF1*/Delta-*parBR1* and Delta-*parBF2*/Delta-*parBR2*. Fragments DNA1 and DNA2 were digested with the enzymes *EcoRI*/*Sall* and *Apal*/*EcoRI*, respectively, and ligated to pNP1S138 linearized with *Apal*/*Sall*, giving rise to pLAL7 (Supplementary Fig. S1). All the PCR reactions were conducted using Pfu DNA polymerase (Thermo Scientific) and 1% formamide (Sigma F9037) was added to the reactions when amplifying *parB*. DNA constructs were checked by sequencing at Macrogen (Korea).

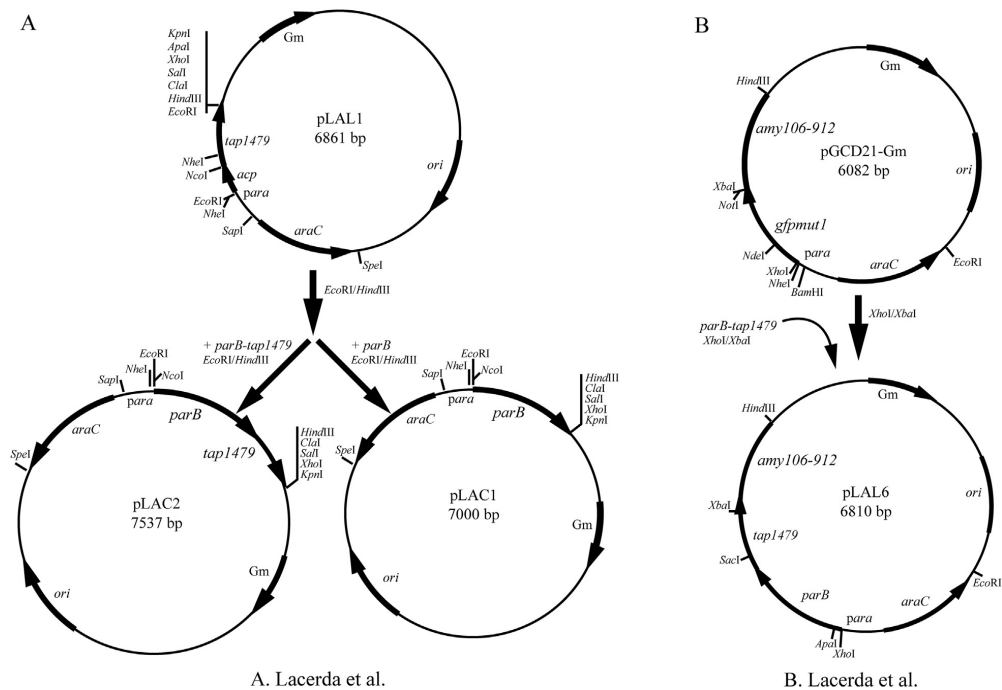
### 2.3. General molecular biology procedures

Standard protocols followed Sambrook et al. (1989). Electrotransformation of *X. citri* was carried out essentially as described in Ferreira et al. (1995). Analyses of southern and western blot were conducted according to the instructions contained in the DIG (Roche) and Westar Nova 2011 (Cyanagen) kits, respectively. Total proteins in cell extracts were quantified using the DC Protein assay kit (Bio-Rad 5000116). Before SDS-PAGE, protein samples were normalized to 0.8 mg/mL, and 3 µg of proteins were loaded per lane. The detection of the protein fusion ParB-TAP in western blot was done using the HRP-conjugated anti-horse (IgG) antibody raised in rabbits (Sigma-A6917) (Ucci et al., 2014). Knockout of *X. citri parB*: first, the complementation plasmids pLAC1 and pLAC2 (replicative) or pLAL6 (integrates into the *amy* locus of *X. citri*) were transformed into *X. citri*; secondly, the resultant strains, *X. citri*/pLAC1, *X. citri*/pLAC2 and *X. citri amy*::pLAL6, were transformed with pLAL7 and selected in NYG-agar supplemented with kanamycin. Only strains in which pLAL7 had integrated into the *X. citri* chromosome by a single crossover event involving either the DNA1 or the DNA2 region would be rescued (Supplementary Fig. S1). Single kanamycin resistant mutants (example: *X. citri*/pLAC1 DNA1::pLAL7 or *X. citri*/pLAC1 DNA2::pLAL7) were subsequently cultivated in NYG, without antibiotics, for 16 h. Next, cells were spread on NYG-agar supplemented with 3% sucrose and 0.05% arabinose (necessary to guarantee the supply of ParB/ParB-TAP) in order to select for those

**Table 1**  
Strains and plasmids.

	Relevant characteristics	Reference
<b>Plasmids</b>		
pBBR1-MCS5	Broad host range vector; Gm <sup>R</sup>	Kovach et al. (1995)
pEB304	pBAD derivative and source of the <i>araC-para-acp-tap1479</i> cassette; Ap <sup>R</sup>	Gully et al. (2003)
pNPTS138	<i>Bacillus subtilis sacB</i> gene; Km <sup>R</sup> ; suicide vector in <i>X. citri</i>	Prof. L. Shapiro (Stanford University, USA)
pGCD21	Derivative of pHF5Ca (Ucci et al., 2014); <i>araC-para-gfpmut1</i> ; <i>amy106-912</i> ; Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> ; integrative vector in <i>X. citri</i>	GenBank KU678206 (G. C. Dantas and H. Ferreira, unpublished)
pAPU1	ParB-TAP expression vector; <i>xylR-pxyl-parB-tap1479</i> ; Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup>	Ucci et al. (2014)
pGCD21-Gm	Derivative of pGCD21; Gm <sup>R</sup>	This work
pLAL1	<i>araC-para-acp-tap1479</i> ; Gm <sup>R</sup> ; replicative vector in <i>X. citri</i>	GenBank KP696472
pLAC1	Derivative of pLAL1; <i>araC-para-parB</i> ; Gm <sup>R</sup>	This work
pLAC2	Derivative of pLAL1; <i>araC-para-parB-tap1479</i> ; Gm <sup>R</sup>	This work
pLAL6	Derivative of pGCD21-Gm; <i>araC-para-parB-tap1479</i> ; Gm <sup>R</sup> ; integrative vector in <i>X. citri</i>	This work
pLAL7	Derivative of pNPTS138; carries DNA fragments 1, genomic coordinates 4590802..4591785, and 2, 4592668..4593677	This work
<b>Strains</b>		
<i>X. citri</i>	Wild-type strain 306; Ap <sup>R</sup>	IBSBF-1594* (Schaad et al., 2006; Schaad et al., 2005)
<i>E. coli</i> DH10B	Cloning strain	Invitrogen
<i>X. citri</i> $\Delta$ parB	Carries a deletion between the genomic coordinates 4591785..4592668	This work
<i>X. citri</i> $\Delta$ parB amy::pLAL6	Expresses ParB-TAP; Gm <sup>R</sup>	This work

\*IBSBF- Instituto Biológico, Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Campinas, SP, Brazil; Ap<sup>R</sup>, km<sup>R</sup>, Gm<sup>R</sup>, ampicillin, kanamycin, and gentamicin resistance, respectively.



**Fig. 1.** The arabinose protein expression vectors for *X. citri*. Maps of the replicative (A) and integrative (B) vectors showing their relevant features and available restriction sites. A) *ori* and Gm, origin of replication and gentamycin resistance cassettes, respectively, derived from pBBR1-MCS5. The DNA fragment containing *araC*, the arabinose repressor, *para*, arabinose promoter, *acp*, which encodes the acyl carrier protein of *E. coli*, and *tap1479*, encoding the TAP1479 tag (Puig et al., 2001), were extracted from pEB304 (Gully et al., 2003) (the *araC-para* region of pEB304, which includes the Ribosome Binding Site, derives from pBAD24 (Guzman et al., 1995)); *parB*, encodes the chromosome segregation protein ParB of *X. citri* (Ucci et al., 2014). B) pGCD21-Gm and pLAL6 carry the DNA fragment *amy106-912* of *X. citri*, which allows the integration of the plasmids into the *amy* locus of the bacterial chromosome by a single crossover event. The complete nucleotide sequences of the main vectors pGCD21 and pLAL1 are available in the GenBank, under accession numbers KU678206 and KP696472, respectively.

mutants that had undergone the second crossover event involving the DNA region (DNA1 or DNA2) that had not been used in the first crossover. Deletion of *parB* was detected by PCR using primers Bup/Bdown (Supplementary Table 1 and Supplementary Fig. S1), and confirmed by Southern blot using *parB* as a probe (data not shown). Diagnostic PCR to *X. citri* was conducted according to the PCR protocol of Coletta-Filho et al. (2006).

#### 2.4. Microscopy

*X. citri* and mutants were cultivated in NYG (supplemented with arabinose (0.05%) or glucose (2%) when needed) from the starting O.D.600 nm of ~0.1 at 30 °C. Upon reaching the O.D.600 nm of ~0.4, cells were immobilized on agarose-covered slides as described in Martins et al. (2010) and immediately visualized using a BX-61 Olympus Microscope equipped with an Orca-Flash2.8 monochromatic camera (Hamamatsu). Chromosome staining was performed by exposing the cells to SYTO 9, according to the instructions contained in the Live/Dead BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes L7007). Image capture and processing was done via the software Cell Sens Dimension ver.11 (Olympus).

#### 2.5. Pathogenicity tests

The host used was sweet orange Pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck), cultivated under greenhouse conditions with temperatures ranging from 25–35 °C. Strains to be tested were cultivated in NYG medium from the starting O.D.600 nm of ~0.1. Before inoculation, cultures were adjusted to the O.D.600 nm of ~0.4 ( $10^8$  CFU/mL) using saline (0.9% NaCl), and cells were sprayed on leaves (between the stages V4-V6: leaves with 5–7 cm; FUNDECITRUS) until runoff. After inoculation, plants were covered with plastic bags for 24 h to help infection. Citrus canker symptoms were scored over a period of 30 days.

#### 3. Statistics

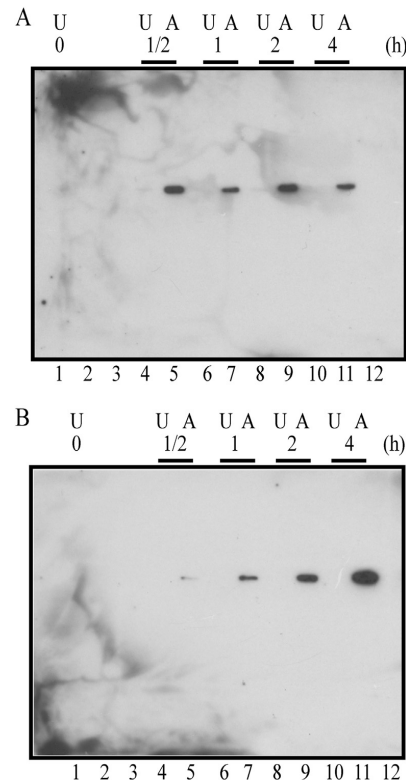
All the data analyses were conducted using the software Graphpad Prism 6. Averages of cell length from different groups under study were compared with internal experimental controls (*X. citri* wild type) applying one-way ANOVA and Tukey post hoc test ( $P < 0.05$ ).

#### Results

##### 3.1. Responsiveness of the arabinose promoter in *X. citri*

Before we could start protein depletion studies of factors suspected to be essential in *X. citri*, we constructed two expression vectors for this plant pathogen (pLAL1 and pLAL6; Fig. 1A and B) based on the pBAD series of Guzman et al. (1995), which is considered a tightly regulated protein expression system in *E. coli*. The arabinose promoter governs transcription in both vectors, and they also allow the production of C-terminal TAP1479 tag fusions to polypeptides of interest (Puig et al., 2001). These vectors differ in the way they are kept within *X. citri*: pLAL1 is replicative, since it carries the origin of replication of the broad host range plasmid pBRR1-MCS5 (Kovach et al., 1995), while pLAL6 is integrative, which is intended to deliver a protein expression platform as a single copy into the bacterial chromosome.

The responsiveness of the arabinose promoter in *X. citri* was subsequently evaluated by western blot using strains deleted for *parB* and carrying the complementation plasmids pLAC2 (replicative) or pLAL6 (integrative). Both, pLAC2 and pLAL6, encode ParB-TAP (Fig. 1A and B). The expression levels of ParB-TAP in these strains were monitored over the course of 4 h after the promoter inducer arabinose was added (Fig. 2). First, untreated *X. citri*  $\Delta parB/pLAC2$  (cultivated without arabinose) exhibited a basal level of promoter leakage, which appeared as very faint bands at all the time points tested from 0 to 4 h



**Fig. 2.** Responsiveness of the arabinose promoter in *X. citri*. *X. citri*  $\Delta parB/pLAC2$  (A) and *X. citri*  $\Delta parB amy::pLAL6$  (B), both expressing ParB-TAP, were cultivated in NYG at 30 °C from the starting O.D.600 nm of ~0.1. The inducer arabinose was added to the media after 3 h of growth. Samples were collected at the time points indicated for the immunodetection of ParB-TAP in western blot. Lanes: 1, 4, 6, 8, and 10, untreated (U); 2, 3, protein ladder (see Fig. S2 for the correspondent SDS-PAGE); 5, 7, 9, and 11, arabinose 0.05% (A). The unique band signal shown corresponds to ParB-TAP of ~54 kDa. Responsiveness of the arabinose promoter in *X. citri*. *X. citri*  $\Delta parB/pLAC2$  (A) and *X. citri*  $\Delta parB amy::pLAL6$  (B), both expressing ParB-TAP, were cultivated in NYG at 30 °C from the starting O.D.600 nm of ~0.1. The inducer arabinose was added to the media after 3 h of growth. Samples were collected at the time points indicated for the immunodetection of ParB-TAP in western blot. Lanes: 1, 4, 6, 8, and 10, untreated (U); 2, 3, protein ladder (see Fig. S2 for the correspondent SDS-PAGE); 5, 7, 9, and 11, arabinose 0.05% (A). The unique band signal shown corresponds to ParB-TAP of ~54 kDa.

(Fig. 2A, lanes 1, 4, 6, 8, and 10). Note that the time points for the untreated samples are just a reference to the period of exposure to arabinose. Noteworthy, leakage from pLAC2 was also observed in pilot experiments using *E. coli* DH10B as a host (data not shown). When arabinose (0.05%) was added to this culture we documented a rapid increase in the amount of ParB-TAP (Fig. 2A, compare lanes 1 and 5). The expression here was investigated after 30 min of induction; however, in pilot experiments, we could detect ParB-TAP as fast as 5 min after the addition of arabinose (the shortest time evaluated), which resembled the fast induction in *E. coli* (Guzman et al., 1995). As the exposure to the inducer increased, we saw a continuous production of ParB-TAP with a slight oscillation among time points (compare lanes 5, 7, 9, and 11). This oscillation resembled a typical dynamics of synthesis/degradation of inducible protein factors, which impose some degree of toxicity within the cells (see below).

A noticeable difference was observed when we analyzed *X. citri*  $\Delta parB amy::pLAL6$ , which carries the integrative system (Fig. 2B). First,



we did not detect any promoter leakage over the period evaluated in comparison with the basal level of expression observed with the replicative vector pLAC2 (compare lanes 1, 4, 6, 8, and 10 in Fig. 2B with the same lanes in Fig. 2A). Secondly, upon arabinose addition, expression of ParB-TAP could also be detected as quickly as 30 min (lane 5), however, in a much lower amount than that observed for the replicative system (compare lanes 5 in Fig. 2A and B). This result is consistent with the single copy status of pLAL6 integrated into the *amy* locus of *X. citri*. As the incubation time with arabinose increased, we saw a gradual accumulation of ParB-TAP (Fig. 2B, compare lanes 5, 7, 9 and 11), which differs markedly from the rapid and high accumulation of the fusion in *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2. Taken together, the rapid/high accumulation of ParB-TAP in *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2, if toxic, may hamper the development of the culture, which is reflected by the oscillation in the production of ParB-TAP followed by a decline in the culture (see next section). Finally, considering that equal amounts of protein extracts were used in each lane, the variation detected in the protein expression levels of untreated and treated cultures reflects the responsiveness of the arabinose promoter in *X. citri*.

### 3.2. Depletion of ParB in *X. citri*

In our previous report of Ucci et al. (2014), we could not obtain a clean deletion of the *X. citri* *parB* gene. This result, allied to the disruptive phenotype exhibited by *X. citri* strains carrying only truncated forms of ParB, suggested that *parB* is essential in this plant pathogen. However, as mentioned above, in the present work we succeeded in deleting *parB* from *X. citri* strains carrying the complementation plasmids pLAC1 and pLAC2 (both replicative, encoding ParB and ParB-TAP, respectively), and pLAL6 (integrative, encoding ParB-TAP) (Fig. 1A and B). The rationale for this was that deletion could be facilitated if ParB were supplied *in trans* (pLAC1 and pLAC2) or ectopically (pLAL6).

In order to find out what would be the best conditions to achieve depletion of ParB, we started by analyzing the growth patterns of the three mutants *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC1, *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2, and *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6 in comparison with the wild type strain (Fig. 3A–D). Cultures were also exposed to arabinose to evaluate the effects of overexpressing ParB. Wild type *X. citri* and mutants were initially cultivated for one and a half generation (3 h, which for the wild type *X. citri* corresponds to the start of the exponential phase (Sumares et al., 2015)), when the inducer arabinose and the repressor glucose were added to the media (Fig. 3A–D, vertical black arrows). After the addition of both sugars, the wild type strain exhibited an almost invariable growth pattern, with only a slight increase in cell mass induced by glucose (Fig. 3A, compare U/black, untreated/control, with A/blue, 0.05% arabinose, and G/orange, 2% glucose). This increase (orange line, glucose, above the blue line, untreated) was due to the abundance of glucose as carbon source. Note that the same behavior was documented for the three *parB*-deleted mutants in the presence of this sugar (Fig. 3, B, C and D). Importantly, this is the condition in which ParB expression is repressed in the mutants (see below), and if glucose repression were to have any effect on cellular growth, the abundance of this carbon source may have masked such an effect (depending on the gene/protein under study), since it boosts the culture.

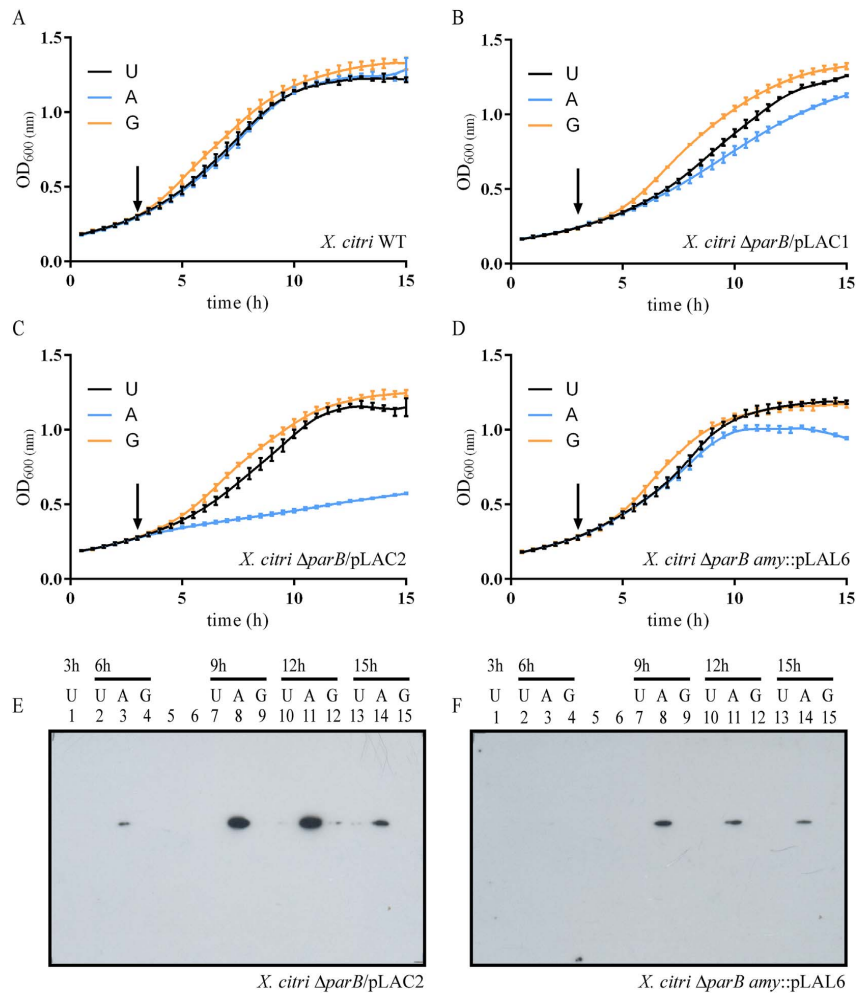
A modest although conspicuous difference was observed in the curves of the three mutants growing without any sugar (Black lines in B, C and D). Overall, there was a slight retard of growth, seen as a shift of the curves to the right in the exponential phase (compare the black lines of the control in A with the mutants in B, C and D). When arabinose was added to the mutants (blue lines in B, C and D), the phenotypes diverged among strains. For those strains carrying replicative plasmids, *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC1 and *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2, entry into the exponential phase was retarded, and only *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC1 was actually able to sustain exponential growth (Fig. 3, B and C, blue lines). Cultures

of *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2 exhibited a very soft increment over the following 12 h in which the cells were monitored (until the time point of 15 h). This strain reached only the O.D.600 nm of  $\sim$ 0.5 as opposed to the standard of  $\sim$ 1.2 seen for the wild type *X. citri* (Fig. 3, compare the blue lines in A and C). The behavior displayed by the *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2 cultures is consistent with a possible toxic effect of ParB-TAP suggested above. Finally, *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6, which expresses ParB-TAP ectopically, had a performance more similar to the control, showing however a very short stationary phase around 10 h, and an anticipation of the death phase beyond  $\sim$ 11 h (Fig. 3, compare the blue lines in A and D). Note here that the toxic effect caused by the accumulation of ParB-TAP in the mutant *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6 happens exactly  $\sim$ 4–5 h after the addition of arabinose, when the blue line splits from the black line (Fig. 3D). So far, our results show that the lack of inducer/ParB led to a delay in culture growth for the three mutants analyzed (untreated condition, black lines, in B, C and D), and overexpression of ParB (arabinose added, blue lines, in B, C and D) had a more deleterious effect in *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2 than in *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC1 or *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6, because of the rapid/high accumulation of the fusion ParB-TAP.

Concomitantly with the O.D. measurements, we also followed the expression of ParB-TAP in western blots of *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2 and *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6. At the time of 3 h (before the addition of any sugar), ParB-TAP was not detected (Fig. 3E and F, lane 1). Three hours after the exposure to the sugars (growth-time of 6 h) ParB-TAP could be easily detected for *X. citri*  $\Delta$ *parB*/pLAC2 (Fig. 3E, lane 3), contrasting sharply with the very faint band seen for *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6 (Fig. 3F, lane 3). Again, the lower expression from pLAL6 reflects the single copy status of this system. The production of ParB-TAP reached a peak at  $\sim$ 6 h of induction for both cultures (Fig. 3E and F, lanes 8), which is consistent with the time in which untreated cultures start the stationary phase (the equivalent of  $\sim$ 10 h of growth). This peak was clearly sustained for approximately 3 h, since the same relative amount of ParB-TAP could be detected at 9 h of induction (12 h culture-growth, lanes 11). Noteworthy, this is the time point in which we observe the most significant difference between the replicative and integrative systems: there is leakage from pLAC2 in the untreated situation (Fig. 3E, lane 10), and although glucose can repress the arabinose promoter, repression is not effective (lane 12). On the contrary, we see a perfect control of ParB-TAP production from pLAL6 without any detectable leakage in all the time points evaluated as untreated or glucose-repressed (Fig. 3F, as example, compare lanes 10–12). Finally, the decline phase, which is clear for *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6, develops beyond 10–12 h of growth, and this is when ParB-TAP starts to disappear (see lanes 14; 15 h of growth). Taken together, data shows that the integrative system was efficient to control the expression of ParB, without leakage in the untreated or repressed (glucose added) situations. Considering that *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6 was able to grow in the absence of ParB (in the form of ParB-TAP) (Fig. 3D), we conclude that this protein is not essential in *X. citri*.

### 3.3. Lack of ParB retards cell division in *X. citri*

We showed recently that *X. citri* mutant strains expressing only truncated forms of ParB exhibited pleiotropic phenotypes, among them cell filamentation, chromosome segregation defects, and loss of pathogenicity (Ucci et al., 2014). To determine the direct contribution of ParB to the first two phenotypes we modulated the expression of ParB-TAP in *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6, and compared cell morphology and nucleoid organization of mutant and wild type strains under the microscope. First, the wild type strain had an average cell length of  $\sim$ 1.7  $\mu$ m, while the *parB* mutant was significantly longer exhibiting cells of  $\sim$ 2.36  $\mu$ m (Table 2; Fig. 4). The increased cell size displayed by *X. citri*  $\Delta$ *parB* *amy*::pLAL6 was observed in arabinose (0.05%), glucose (2%), and even in the untreated culture. Long filaments and chains (which are indicative of cell division and chromosome segregation



**Fig. 3.** ParB depletion. Strains of *X. citri*, WT and deleted for *parB*, were cultivated in NYG at 30 °C from the starting O.D.600 nm of ~0.1. After 3 h of growth, arabinose (0.05%), and glucose (2%) were added to the cultures (black arrows in A, B, C and D). O.D.600 nm measurements were taken every 30 min, and each point in the curves corresponds to the average O.D.600 nm calculated from three independent experiments; vertical bars, standard deviation. Curves are color-coded and correspond to U, untreated (control) cells; A, 0.05% arabinose; G, 2% glucose. (E) and (F) immunodetection of ParB-TAP in samples of *X. citri ΔparB/pLAC2* and *X. citri ΔparB amy::pLAL6*, respectively. Lanes (U, untreated cells; A, 0.05% arabinose; G, 2% glucose): 1, U3 h; 2–4, U6 h, A6 h, and G6 h; 5–6, molecular weight markers (see Fig. S3 for the correspondent SDS-PAGE); 7–9, U9 h, A9 h, G9 h; 10–12, U12 h, A12 h, G12 h; 13–15, U15 h, A15 h, G15 h. The band shown corresponds to ParB-TAP of ~54 kDa. (For interpretation of the references to color in this figure, the reader is referred to the web version of this article.)

defects, respectively) were not observed either for the wild type or the *parB* mutant. The wild type strain exhibited only 0.2% of anucleated rods, which is consistent with our previous reports (Silva et al., 2013; Ucci et al., 2014). On the other hand, *X. citri ΔparB amy::pLAL6* showed on average three times more anucleated cells in comparison with the wild type strain in practically all the treatments (untreated cultures, 0.05% arabinose, and 2% glucose); although, it did not reach an order of magnitude.

When we evaluated the nucleoid organization of both wild type and *parB* mutant, we did not detect clear signs of aberration (Fig. 4; SYTO 9). Apart from the noticeable increase of size of the *parB* mutants, both strains had a proper distribution of the chromosomal mass irrespective of the treatment imposed. Taken together, we conclude that lack of *parB*, which happened in the untreated culture of *X. citri ΔparB amy::pLAL6* and in the presence of glucose, leads to increased cell size (Table 2). In addition, overexpression of ParB by cells of *X. citri ΔparB*



**Table 2**  
Cell length of ParB-depleted *X. citri*.

	Average cell length $\pm$ SD ( $\mu\text{m}$ ) <sup>†</sup>	
	<i>X. citri</i>	<i>X. citri</i> $\Delta$ <i>parB amy::pLAL6</i>
Untreated	1.65 $\pm$ 0.45 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.71 <sup>b</sup>
Arabinose	1.71 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	2.32 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>
Glucose	1.85 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	2.34 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>

<sup>†</sup> Average cell length  $\pm$  standard deviation (n = 100) of *X. citri* and *X. citri*  $\Delta$ *parB amy::pLAL6 measured after 6 h of treatment.*

<sup>a</sup> Averages differ statistically (one-way ANOVA followed by Tukey post-test;  $P < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Averages differ statistically (one-way ANOVA followed by Tukey post-test;  $P < 0.05$ ).

*amy::pLAL6* treated with arabinose produced the same effect. Therefore, increased cell size might be attributed to a delay in chromosome segregation/clearance with subsequent delay of cell division that happens in the absence of ParB or when there is an imbalance/overexpression of this protein.

### 3.4. ParB depletion does not interfere with the ability of *X. citri* to colonize citrus

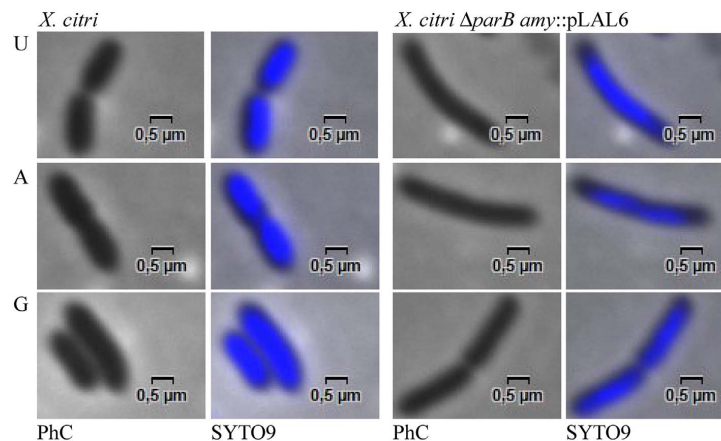
The ability to colonize citrus and cause disease was evaluated using the mutant strain *X. citri*  $\Delta$ *parB amy::pLAL6. As demonstrated above, *X. citri*  $\Delta$ *parB amy::pLAL6* does not express ParB in the absence of arabinose (Fig. 3F, untreated conditions). Bacterial strains were cultivated in NYG without arabinose or glucose, and then spray-inoculated onto leaves of the susceptible host sweet orange Pera. The appearance of citrus canker symptoms were scored over the course of 30 days post-inoculation. The wild type strain *X. citri* induced the typical brownish corky-like symptoms of citrus canker, which became visible ~20 days post-inoculation (Fig. 5B). No lesions were observed on leaves sprayed with the carrier saline (5A). The mutant strain *X. citri*  $\Delta$ *parB amy::pLAL6* was as competent as the wild type to colonize citrus leaves and induce the symptoms of citrus canker (5C). The incidence of lesions, and time of appearance were identical. Therefore, we conclude that the lack of ParB does not interfere with pathogenicity of *X. citri*.*

## 4. Discussion

Chromosome segregation is a vital process that coordinates the proper partitioning of the genetic material to the daughter cells before cytokinesis. In *X. citri*, segregation of newly replicated chromosomal origins is asymmetric and depends, at least in part, on the function of the centromere organizing factor ParB (Ucci et al., 2014). Chromosomally encoded ParB is a well conserved bacterial protein (Livny et al., 2007), which is essential in only a few organisms, but its absence may lead to diverse pleiotropic effects (reviewed by Mierzejewska and Jagura-Burdzy (2012)). A preliminary characterization of *X. citri* ParB by our group was conducted using truncated forms of the protein, since we were not able to knockout the *parB* gene in this plant pathogen. Here, we extended our analyses of *X. citri* ParB using protein depletion, which was possible due to the use of newly developed protein expression vectors dedicated to this plant pathogen. ParB supplied *in trans* was decisive to allow a clean deletion of the *X. citri parB* gene, and the subsequent modulation of ParB expression from an integrative complementation vector corroborated its involvement in chromosome segregation.

In the current work we demonstrate that ParB is not essential in *X. citri*, since we documented growth of *X. citri*  $\Delta$ *parB amy::pLAL6* in conditions where ParB cannot be detected. However, the *parB* null mutant (*X. citri*  $\Delta$ *parB amy::pLAL6*) was obtained only after we used the depletion system, which may seem contradictory. A tentative explanation for this is that chromosome segregation is an essential process for all living cells; therefore, cells may have evolved in such a way as not to rely entirely on a single system to accomplish this task. The ParAB system qualifies for a redundant player as it helps segregation in conjunction with forces such as replication (the extrusion-capture model for segregation coupled to replication), transcription (genes are oriented in such a way that concerted transcription may exert force upon them and the chromosome towards the cellular poles), and chromosome compaction (Dworkin & Losick, 2002; Lemon and Grossman, 2001; Wang et al., 2013). However, being redundant does not imply that *parB* can be easily knocked out. It is conceivable that *parB* knockout is an unfavorable event that becomes possible and easier when it has a smoother transition. The smoother transition happens when we put within the cells an extra copy of *parB* (the depletion system). Only after that we succeeded in deleting the native gene, perhaps transforming a rare event in a frequent one.

The protein expression vectors described here use the arabinose



**Fig. 4.** Cell morphology. Wild type *X. citri* and *X. citri*  $\Delta$ *parB amy::pLAL6* were cultivated from the starting O.D.600 nm of ~0.1 in NYG medium, supplemented or not with arabinose (0.05%) or glucose (2%). When cultures reached the O.D.600 nm of ~0.4 (~6 h of growth), cells were stained with SYTO 9 and visualized by phase contrast (PhC) and fluorescence (SYTO 9) microscopy. U, untreated; A, 0.05% arabinose; G, 2% glucose. Magnification of 100  $\times$ .

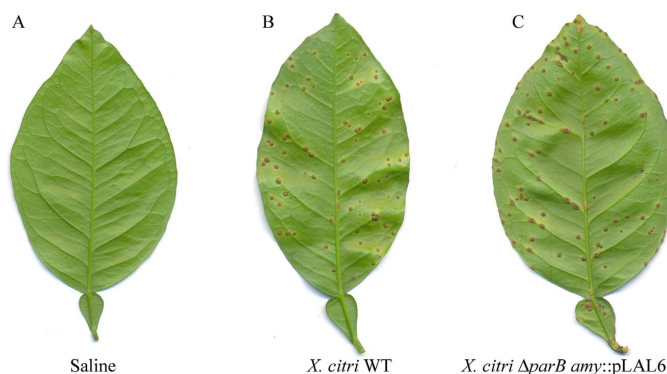


Fig. 5. Lack of ParB does not interfere with the pathogenicity of *X. citri*. Bacterial strains were cultivated in NYG for 12 h, and subsequently diluted in saline to reach the O.D.600 nm of ~0.4. Cell suspensions were spray-inoculated on leaves of sweet orange cultivar Pera. Pictures were taken 30 days post-inoculation. Saline, 0.9% NaCl.

promoter of the pBAD series, which is largely used in *E. coli* and considered to be tightly regulated in many bacteria (Guzman et al., 1995). Sukchawalit et al. (1999) reported the construction and characterization of a series of replicative vectors based on the fusion of the arabinose promoter and the broad host range replicon/backbone of the pBBR1 series of cloning vectors (Kovach et al., 1995). Their system was evaluated for optimal expression conditions using *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* as a host, and subsequently, Dunger et al. (2007) used one of these vectors to complement a *X. citri gumD* mutant strain. However, nobody had ever characterized the responsiveness of the arabinose promoter in *X. citri*. Apart from a replicative arabinose protein expression system, we report here on an integrative version of it (pLAL6). The integrative system enabled us to fine-tune protein expression in *X. citri*, here demonstrated by the possibility of carrying out the depletion of ParB-TAP in the mutant strain *X. citri ΔparB amy::pLAL6* (Fig. 3). Although useful, the arabinose promoter in a replicative vector exhibited considerable leakage (Fig. 3), which alone might be enough to complement a mutant without the need for induction. Control of the arabinose promoter in *X. citri* was better achieved when we used the integrative vector pLAL6. When pLAL6 was placed as a single copy into the bacterial chromosome, it allowed a finer modulation of ParB-TAP expression with no detectable leakage, even in the absence of the repressor glucose. Comparatively to promoters like *tac*, *lac*, vanillate, and xylose (Amann et al., 1988; Lewis and Marston, 1999; Thanbichler et al., 2007) that were already tested in *X. citri* (A. P. Ucci, unpublished results; Martins et al. (2010)), the arabinose promoter was superior in responsiveness and capability to shut down protein expression to undetectable levels.

The clean deletion of the *X. citri parB* gene not only enabled us to extend the characterization of its function, but it also clarified the occurrence of some phenotypic traits observed in the previous report of Ucci et al. (2014). Here we showed that lack (*X. citri ΔparB amy::pLAL6*; untreated or glucose-repressed) or over-expression (*X. citri ΔparB amy::pLAL6* exposed to arabinose) of ParB (in the form of ParB-TAP) in *X. citri* led to a retard in cell growth/division, and altered cell size, and a slight increase in the number of anucleated rods. These results are in line with the phenotypes observed for several model bacteria (reviewed by Mierzejewska and Jagura-Burdzy (2012)). However, the filamentation phenotype observed in the *parB* disruption mutant *X. citri parB::pAPU2* (5% of the cells; Ucci et al. (2014)) was not detected here for *X. citri ΔparB amy::pLAL6*. Depletion of ParB caused a mild morphological effect in *X. citri ΔparB amy::pLAL6*, which was manifested by a slight, although significant, increase in cell length when compared to the wild type strain. Noteworthy, increased cell size accompanied by a slowdown on cell growth have been a trend whenever the chromosome segregation function is affected in *X. citri*.

This can be achieved by thermal shock (Sumares et al., 2015), treatment with alkyl gallates, which are potent FtsZ inhibitors (Krol et al., 2015; Silva et al., 2013), disruption of *parB* (Ucci et al., 2014), and now, *parB* deletion/ParB depletion. Therefore, we conclude that the filamentation phenotype of *X. citri parB::pAPU2* (Ucci et al., 2014) was directly associated with the expression of truncated forms of ParB within *X. citri*.

Some reports on the literature offer support to a link among ParB, motility and pathogenicity. Lack of ParB, and also of its partner protein ParA, has been implicated with altered motility in *P. aeruginosa* (Bartosik et al., 2009). In *X. citri*, an intact flagellum, and consequently motility, is necessary for mature biofilm formation on citrus leaves, which in turn is required for host plant colonization and disease development (Li & Wang, 2011; Malamud et al., 2011; Rigano et al., 2007). Here, depletion of ParB in *X. citri ΔparB amy::pLAL6* did not affect its ability to colonize citrus plants and to induce citrus canker symptoms. So far, we have not detected alterations in motility in our mutants *X. citri ΔparB/pLAC1*, *X. citri ΔparB/pLAC2* and *X. citri ΔparB amy::pLAL6* (unpublished observation). Finally, the arabinose protein expression vectors described in the present work are valuable tools for protein expression, gene complementation, protein depletion, and especially, to assist in the deletion of essential genes in *X. citri*.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.03.005>.

#### Acknowledgments

LAL and LBC received scholarships from CAPES- Brazil. This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Grants 2013/14013-7 and 2013/50367-8). We thank Centro de Citricultura Sylvio Moreira for supplying the citrus plants used in the pathogenicity tests.

#### References

- Amann, E., Ochs, B., Abel, K.J., 1988. Tightly regulated *tac* promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69, 301–315.
- Badrinarayanan, A., Le, T.B., Laub, M.T., 2015. Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 31, 171–199.
- Bartosik, A.A., Mierzejewska, J., Thomas, C.M., Jagura-Burdzy, G., 2009. ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilizes the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. *Microbiology* 155, 1080–1092.
- Belasque Jr., J., Fernandes, N.G., Massari, C.A., 2009. The success of eradication campaign os citrus canker in São Paulo states, Brazil. *Summa Phytopathol.* 35, 91–92.
- Brunings, A.M., Gabriel, D.W., 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol. Plant Pathol.* 4, 141–157.
- Coletta-Filho, H.D., Takita, M.A., Souza, A.A., Neto, J.R., Destefano, S.A.L., Hartung, J.S., Machado, M.A., 2006. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected

- citrus plants. *J. Appl. Microbiol.* 100, 279–285.
- da Silva, A.C., Ferro, J.A., Reinach, F.C., Farah, C.S., Furlan, L.R., Quaggio, R.B., Monteiro-Vitorello, C.B., Van Sluys, M.A., Almeida, N.F., Alves, L.M., do Amaral, A.M., Bertolini, M.C., Camargo, L.E., Camarotte, G., Cannavan, F., Cardozo, J., Chambergo, F., Ciapina, L.P., Cicarelli, R.M., Coutinho, L.L., Cursino-Santos, J.R., El-Dorry, H., Faria, J.B., Ferreira, A.J., Ferreira, R.C., Ferro, M.L., 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., 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417, 459–463.
- Donovan, C., Schwaiger, A., Kramer, R., Bramkamp, M., 2010. Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 192, 3441–3451.
- Dunger, G., Relling, V.M., Tondo, M.L., Barreras, M., Ielpi, L., Orellano, E.G., Ottado, J., 2007. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. *Arch. Microbiol.* 188, 127–135.
- Dworkin, J., Losick, R., 2002. Does RNA polymerase help drive chromosome segregation in bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14089–14094.
- Ferreira, H., Barrientos, F.J.A., Baldini, R.L., Rosato, Y.B., 1995. Electrotransformation in three pathogens of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 651–655.
- Fogel, M.A., Waldor, M.K., 2006. A dynamic, mitotic-like mechanism for bacterial chromosome segregation. *Genes Dev.* 20, 3269–3282.
- Gerdes, K., Howard, M., Szardyni, F., 2010. Pushing and pulling in prokaryotic DNA segregation. *Cell* 141, 927–942.
- Gottwald, T.R., Graham, J.H., Schubert, T.S., 2002. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Online Plant Health Progress*. <http://dx.doi.org/10.1094/PHP-2002-0812-01-RV>.
- Graham, T.G., Wang, X., Song, D., Eton, C.M., van Oijen, A.M., Rudner, D.Z., Loparo, J.J., 2014. ParB spreading requires DNA bridging. *Genes Dev.* 28, 1228–1238.
- Gruber, S., Errington, J., 2009. Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* 137, 685–696.
- Gully, D., Moïnier, D., Loiseau, L., Bouveret, E., 2003. New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification. *FEBS Lett.* 548, 90–96.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., Beckwith, J., 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121–4130.
- Hwang, L.C., Vecchiarelli, A.G., Han, Y.W., Mizuuchi, M., Harada, Y., Funnell, B.E., Mizuuchi, K., 2013. ParA-mediated plasmid partition driven by protein pattern self-organization. *EMBO J.* 32, 1238–1249.
- Iretton, K., Gunther, N.W.T., Grossman, A.D., 1994. spo0J is required for normal chromosome segregation as well as the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176, 5320–5329.
- Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop 2nd, R.M., Peterson, K.M., 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.
- Krol, E., de Sousa, Borges A., da Silva, I., Polaquini, C.R., Regasini, L.O., Ferreira, H., Scheffers, D.J., 2015. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. *Front. Microbiol.* 6, 390.
- Lemon, K.P., Grossman, A.D., 2001. The extrusion-capture model for chromosome partitioning in bacteria. *Genes Dev.* 15, 2031–2041.
- Leonard, T.A., Moller-Jensen, J., Lowe, J., 2005. Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 360, 523–535.
- Lewis, P.J., Marston, A.L., 1999. GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* 227, 101–110.
- Li, J., Wang, N., 2011. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. *PLoS One* 6, e21804.
- Lim, H.C., Surortsev, I.V., Beltran, B.G., Huang, F., Bewersdorf, J., Jacobs-Wagner, C., 2014. Evidence for a DNA-relay mechanism in ParABS-mediated chromosome segregation. *elife* 3, e02758.
- Lin, D.C., Grossman, A.D., 1998. Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. *Cell* 92, 675–685.
- Livny, J., Yamaichi, Y., Waldor, M.K., 2007. Distribution of centromere-like parS sites in bacteria: insights from comparative genomics. *J. Bacteriol.* 189, 8693–8703.
- Malamud, F., Torres, P.S., Roeschlin, R., Rigano, L.A., Enrique, R., Bonomi, H.R., Castagnaro, A.P., Marano, M.R., Vojnov, A.A., 2011. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology* 157, 819–829.
- Martins, P.M., Lau, I.F., Bacci, M., Belasque, J., do Amaral, A.M., Taboga, S.R., Ferreira, H., 2010. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS Microbiol. Lett.* 310, 76–83.
- Mierzejewska, J., Jagura-Burdzy, G., 2012. Prokaryotic ParA-ParB-parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. *Plasmid* 67, 1–14.
- Mohl, D.A., Easter Jr., J., Gober, J.W., 2001. The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 42, 741–755.
- Murray, H., Ferreira, H., Errington, J., 2006. The bacterial chromosome segregation protein spo0J spreads along DNA from parS nucleation sites. *Mol. Microbiol.* 61, 1352–1361.
- Pinho, M.G., Kjos, M., Veening, J.W., 2013. How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 601–614.
- Ptacin, J.L., Lee, S.F., Garner, E.C., Toro, E., Eckart, M., Comolli, L.R., Moerner, W.E., Shapiro, L., 2010. A spindle-like apparatus guides bacterial chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* 12, 791–798.
- Puig, O., Caspari, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., Seraphin, B., Shevchenko, A., Mann, M., 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification: a generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Methods* 24, 218–229.
- Rigano, L.A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendin, L., Filippone, P., Torres, P.S., Questa, J., Dow, J.M., Castagnaro, A.P., Vojnov, A.A., Marano, M.R., 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20, 1222–1230.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G.H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K., Vidaver, A.K., 2005. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. *nom. rev. comb. nov.*, *X. fuscans* subsp. *aurantifoliae* (ex Gabriel 1989) sp. nov. *nom. rev. comb. nov.*, and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. *nom. rev. comb. nov.*; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. *comb. nov. nom. nov.*; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. *nom. rev.*; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 494–518.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P.E., Stromberg, V.K., Vidaver, A.K., 2006. Emended classification of *Xanthomonas* pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 690–695.
- Silva, I.C., Regasini, L.O., Petronio, M.S., Silva, D.H., Bolzani, V.S., Belasque Jr., J., Sacramento, L.V., Ferreira, H., 2013. Antibacterial activity of alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *J. Bacteriol.* 195, 85–94.
- Sukchawalit, R., Vattanaviboon, P., Sallabhan, R., Mongkolsuk, S., 1999. Construction and characterization of regulated l-arabinose-inducible broad host range expression vectors in *Xanthomonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* 181, 217–223.
- Sumares, J.A.P., Morao, L.G., Martins, P.M., Martins, D.A., Gomes, E., Belasque Jr., J., Ferreira, H., 2015. Temperature stress promotes cell division arrest in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *MicrobiologyOpen*. <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3323>.
- Thanbichler, M., Iniesta, A.A., Shapiro, L., 2007. A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res.* 35, e137.
- Ucci, A.P., Martins, P.M., Lau, I.F., Bacci Jr., M., Belasque Jr., J., Ferreira, H., 2014. Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. *MicrobiologyOpen* 3, 29–41.
- Vecchiarelli, A.G., Hwang, L.C., Mizuuchi, K., 2013. Cell-free study of F plasmid partition provides evidence for cargo transport by a diffusion-ratchet mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1390–E1397.
- Wang, X., Montero Llopis, P., Rudner, D.Z., 2013. Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat. Rev. Genet.* 14, 191–203.