

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

**CARACTERIZAÇÃO DE TRANSGLICOSILASES LÍTICAS DE
MUREÍNA EM *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 E
ESTUDO FUNCIONAL DAS LTS *mltB2.1* E *mltB2.2*
ASSOCIADAS AO ELEMENTO *TnXax1*.**

Amanda Carolina Paulino de Oliveira

Bióloga

2018

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

**CARACTERIZAÇÃO DE TRANSGLICOSILASES LÍTICAS DE
MUREÍNA EM *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 E
ESTUDO FUNCIONAL DAS LTS *mltB2.1* E *mltB2.2*
ASSOCIADAS AO ELEMENTO *TnXax1*.**

Amanda Carolina Paulino de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Coorientador: Dr. Rafael Marini Ferreira

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

O48c Oliveira, Amanda Carolina Paulino de
Caracterização de transglicosilases líticas de mureína em
Xanthomonas citri subsp. *citri* 306 e estudo funcional das Lts *mltB2.1* e
mltB2.2 associadas ao elemento *TnXax1* / Amanda Carolina Paulino
de Oliveira. -- Jaboticabal, 2018
xi, 105 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Alessandro de Mello Varani
Coorientador: Rafael Marini Ferreira
Banca examinadora: Henrique Ferreira, Daniel Guariz Pinheiro
Bibliografia

1. Genômica comparativa. 2. Mutação sítio-dirigida. 3.
Transferência lateral. 4. Virulência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Amanda Carolina Paulino de Oliveira, nascida em 18 de fevereiro de 1993 no município de Santa Adélia, São Paulo. Concluiu o ensino médio em 2011 no colégio XI de Agosto (SETA), na cidade de Santa Adélia, SP. Em 2012 iniciou a graduação em Ciências Biológicas (Modalidade Bacharelado) na Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal (FCAV), com conclusão em 2015. Em 2012 fez estágio no programa de gerenciamento de resíduos químicos – INTRALAB e, de 2013 até 2015 fez estágio no Departamento de Tecnologia da Unesp de Jaboticabal, atuando na área de investigação das interações planta-patógeno, genômica comparativa e mutagênese sítio-dirigida. Em 2016 iniciou o mestrado acadêmico pelo Programa de Microbiologia Agropecuária na FCAV, concluindo-o em 2018. No mesmo ano, iniciou o curso de Licenciatura em Ciências no Campus de Jaboticabal, concluindo-o em 2017.

*À minha família, mãe, pai, irmão,
aos meus avós, segundos pais,
ao meu amor e companheiro ,
com amor,
Dedico.*

Agradecimentos

Primeiramente, agradecer a Deus por me acompanhar e iluminar todos os meus passos, me guiar, me dar forças, paciência e por permitir a conclusão de mais um trabalho.

Ao Professor Jesus e Professora Maria Inês, obrigada pelos ensinamentos, contribuíram muito para meu crescimento profissional. Agradeço também à recepção, orientação e utilização do laboratório de bioquímica e biologia molecular (LBM) e materiais.

Ao orientador Rafael Marini, um excelente cientista com quem tive o prazer de aprender um pouco sobre Ciência; obrigada pelos ensinamentos, puxões de orelha e confiança durante todos esses anos.

Ao orientador Alessandro Varani, obrigada pela atenção, tempo, apoio nos momentos de insegurança e pela confiança a mim dedicada.

Ao Projeto BIGA (Biologia, genômica e associados) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e auxílio para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica- CREBIO, pelas bibliotecas de Shotgun, Cosmídeos, pelos equipamentos disponibilizados durante o trabalho e em especial à Agda e Marilza.

Ao Professor Henrique Ferreira de Rio Claro, por ceder o Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) para algumas análises e por contribuir para o trabalho. Obrigada a todos que me receberam no LGB, em especial à Lúcia Bonci, pela recepção e auxílio na realização dos experimentos.

Aos membros da banca, obrigada por aceitarem o convite e pelas contribuições feitas ao trabalho.

Aos meus pais e irmão, Maria, Marco e Vitor, por entenderem e respeitarem o caminho e a profissão que escolhi, principalmente pela confiança e amor a mim dedicados.

À toda minha família, pela dedicação, confiança, cumplicidade e amor incondicional durante toda minha trajetória acadêmica. Em especial, à Tia Joana, meu exemplo e inspiração como profissional.

Aos bons amigos que conheci durante esse trajeto na universidade, Gabriella, Gabriele, Andrei, Mirela, Julia, Jéssica, Talita, Fernanda, Tais.

Aos amigos distantes, obrigada pela paciência, por entenderem e respeitarem minhas escolhas.

Obrigada pela convivência e companheirismo durante todo o trabalho no LBM. Aos amigos, Rafael, Helen, Bruno, Danillo, Luis, Jéssica, Catarina, Michelle, Julie, Tamires, Ana Carolina, Juan e Sônia, Claudênia, Bruna, Aline, Daniela, Wallynson, lashilei, Flavinha, Flávia Carvalho, Mariza, Juliana e Natasha. Obrigada pela companhia, boas risadas e pelos cafés para recuperar as energias!

Ao meu companheiro Túlio, obrigada pelo incentivo, apoio, por confiar e acreditar incondicionalmente nos meus sonhos, você faz parte de todas essas realizações!

A todos que contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO -	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 <i>Xanthomonas citri</i> subsp <i>citri</i> 306 A e o cancro cítrico	4
2.2 A importância da transferência gênica horizontal para a diversidade genética em <i>Xanthomonadales</i>	8
2.3 O sistema de secreção tipo 3: SST3	10
2.3.1. A montagem e instalação do SST3 no envelope bacteriano	12
2.4 Transglicosilases líticas de mureína: LTs.....	13
2.4.1. As LTs e sua contribuição para a patogenicidade e virulência em XccA 19	
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Identificação e análise <i>in silico</i> das proteínas transglicosilases em <i>Xanthomonas citri</i>	21
3.2 Linhagens bacterianas, meios de cultura e cultivo de células.....	21
3.3 Mutação na ORF XAC_RS16355.....	23
3.3.1. Isolamento de DNA plasmidial contendo a ORF XAC_RS16355	26
3.3.2. Obtenção do mutante Δ XAC_RS16355.....	26
3.4 Subclonagem em <i>E. coli</i> DH10B	27
3.4.1. Preparação de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> DH10B.....	27
3.4.2. Transformação do vetor pNPTS138- Δ XAC_RS16355 em células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> DH10B.....	28
3.4.3. Seleção e confirmação das colônias	28

3.5	Transformação de células de XccA eletrocompetentes	29
3.6	Confirmação da mutação em XccA	30
3.7	Teste de patogenicidade por infiltração.....	32
3.8	Curva de crescimento bacteriano <i>ex planta</i>	33
3.9	Curva de crescimento bacteriano <i>in planta</i>	33
3.10	Ensaio de aspersão <i>in planta</i>	34
3.11	Ensaio de formação de biofilme	35
3.12	Ensaio de produção de goma xantana	35
3.13	Ensaio de agregação celular	36
3.14	Motilidade bacteriana	37
3.15	Análise estatística	37
3.16	Estimativa do número de cópias de plasmídeo	37
4	RESULTADOS	39
4.1	Análise <i>in silico</i> : Diversidade e classificação das transglicosilases identificadas no genoma de XccA	39
4.2	Obtenção dos mutantes $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$	44
4.3	Análise fenotípica das LTs <i>mltB2.1</i> e <i>mltB2.2</i>	45
4.4	Análise da formação de biofilme, produção de goma xantana e agregação celular	52
4.5	Análise das motilidades “swimming” e “swarming”	56
4.6	Identificação do número de cópias do plasmídeo pXAC64	58
5	DISCUSSÃO.....	59
5.1	Diversidade de LTs encontradas no genoma de XccA.....	59
5.2	As LTs da família 3B <i>mltB2.1</i> e <i>mltB2.2</i> não são essenciais para a viabilidade de XccA, mas estão relacionadas com a progressão da doença.....	65
5.3	A diferença entre o número de cópias de <i>mltB2.1</i> e <i>mltB2.2</i> pode influir na expressão global gênica	68

5.4	O possível papel das transglicosilases MltB2 no atraso do cancro cítrico e contribuição para o <i>fitness</i>	69
6	CONCLUSÕES.....	71
7	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE	81
	Apêndice A. Pesquisa das LTs em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 A, utilizando o banco de dados NCBI.	81
	Apêndice B. Condições das reações de PCRs e digestões utilizadas para a mutação sítio-dirigida da ORF XAC_RS16355.	82
	Apêndice C. Alinhamento de aminoácidos para as LTs de XccA.	85

CTNBIO

A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança aprovou o desenvolvimento do projeto intitulado “CARACTERIZAÇÃO DE TRANSGLICOSILASES LÍTICAS DE MUREÍNA EM *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 E ESTUDO FUNCIONAL DAS LTs *mltB2.1* E *mltB2.2* ASSOCIADAS AO ELEMENTO TnXax1”.

CARACTERIZAÇÃO DE TRANSGLICOSILASES LÍTICAS DE MUREÍNA EM *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 E ESTUDO FUNCIONAL DAS LTS *mltB2.1* E *mltB2.2* ASSOCIADAS AO ELEMENTO *TnXax1*.

RESUMO - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (XccA) é o agente causal do cancro cítrico (CC), doença endêmica que afeta a citricultura. Durante a interação patógeno-hospedeiro o sistema de secreção tipo três (SST3) codificado pela XccA age na translocação de efetores e no estabelecimento da doença. A montagem do aparato de SST3 depende da síntese, remodelagem e degradação da parede celular bacteriana, sendo este processo realizado pela ação enzimática de transglicosilases líticas de mureína (LTs). XccA codifica diversas LTs, porém, pouco é conhecido sobre a diversidade de famílias e relação com a virulência. Dentre as LTs com provável relação com a virulência, duas ORFs parálogas presentes no cromossomo e plasmídeo pXAC64, respectivamente; são genes passageiros do *TnXax1*, um transposon da família Tn3, relacionado a evolução e emergência da patogenicidade nas *Xanthomonadales*. Portanto, este estudo objetivou elucidar o provável papel e diversidade das LTs presentes no genoma de XccA, caracterizando funcionalmente as LTs presentes em *TnXax1* pela técnica de mutação sítio dirigida. Foram identificadas no genoma de XccA 13 LTs, sendo 12 pertencentes às famílias: 1A, 1B, 1C, 1D, 1F, 1G, 3A, 3B (2 cópias), 5A e 6A, e uma não classificada. A LT não classificada, é exclusiva do gênero *Xanthomonas* e relacionada à família 3B, porém contém um domínio adicional relacionado ao metabolismo de carboidratos. As LTs classificadas em famílias apresentam provável função relacionada com a remodelagem da parede celular para inserção de sistemas de secreção tipo 3, 4 e 6, inserção de flagelo, divisão celular, reciclagem da parede celular e degradação e controle da produção do peptidoglicano. As LTs do *TnXax1* pertencem a família 3B, não são essenciais para XccA e desenvolvimento do CC, porém estão relacionadas ao aumento da virulência, diminuição da formação de biofilme, agregação e aumento na produção de goma xantana, corroborando o papel do *TnXax1* como agente propagador da patogenicidade e virulência em *Xanthomonadales*. Em resumo, os resultados lançam novos conhecimentos frente ao papel das LTs com o metabolismo do peptidoglicano e relação com os mecanismos de transferência lateral, virulência e patogenicidade de XccA.

Palavras-chave: genômica comparativa, mutação sítio-dirigida, transferencial lateral, virulência.

CHARACTERIZATION OF LYTIC MUREIN TRANSGLYCOSYLASES IN *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 AND FUNCTIONAL STUDY OF Tn*Xax1* ELEMENT ASSOCIATED LTS *mltB2.1* AND *mltB2.2*.

ABSTRACT - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (XccA) is a causal agent of type A citrus canker (CC), one of the most devastating citriculture diseases. Type 3 Secretion Systems (T3SS) play a fundamental role in XccA pathogenicity. T3SS components are embedded in the bacterial inner and outer membrane and act as a channel for injection of effector proteins directly into the plant host cell cytosol. T3SS assembly and installation relies on bacterial cell wall synthesis, remodeling and degradation. Murein lytic transglycosylases (LT) are important in this process and are responsible for peptidoglycan cleavage and its remodeling. Information about the XccA LT arsenal is scarce: little is known about family diversity, their exact role and their connection to virulence in this bacterium. Among the LTs with probable relation to virulence, two paralogue ORFs (one in chromosome, one in pXAC64 plasmid) are passenger genes of the Tn3 family transposon Tn*Xax1*, known to play a significant role for evolution and emergence of pathogenicity in *Xanthomonadales*. This study addresses LT diversity in the XccA genome and examines the role of plasmid and chromosomal Tn*Xax1* LT passenger genes using site-directed deletion mutagenesis and functional characterization. We identified 13 XccA LTs: 12 belong to families 1A, 1B, 1C, 1D (2 copies), 1F, 1G, 3A, 3B (2 copies), 5A, 6A and one which is non-categorized. This non-categorized gene, is exclusive to the *Xanthomonas* genus and related to the 3B family but contains an additional domain linked to carbohydrate metabolism, whilst the other catalyzes peptidoglycan biosynthesis, and is widely distributed in gamma-proteobacteria. The categorized LTs are probably involved in cell wall remodeling to allow insertion of type 3, 4 and 6 secretion systems, flagellum assembly, division and recycling of cell wall and degradation and control of peptidoglycan production. The Tn*Xax1* passenger LTs (3B family) are not essential to XccA and CC development but are implicated in virulence, biofilm production and aggregation decrease and xanthan gum production increase, corroborating the role of Tn*Xax1* transposon as a virulence and pathogenicity propagating agent in XccA. These findings also suggest that LTs acquisition by horizontal gene transfer mediated by Tn*Xax1* improved bacterial fitness, bringing adaptive advantages to the plant-pathogen interaction process.

Key words: comparative genomics, lateral gene transfer, site-directed deletion mutagenesis, virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) CC observado em folhas, (B) fruto e (C) ramo de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Nas folhas e fruto está presente o halo amarelo característico ao redor das lesões. Fonte: Fundecitrus, 2018. p. 5

Figura 2. Fatores de virulência conhecidos em *Xanthomonas*. *Xanthomonas spp.* dependem dos sistemas SST2 e SST3, adesinas, EPS e lipopolissacarídeos (LPS) para interagir com sucesso com suas plantas hospedeiras. O LPS pode ser liberado da superfície bacteriana e demonstrar respostas de defesa da planta. LPS e outros PAMPs são presumivelmente detectados por receptores específicos de plantas que ativam as respostas de defesa das plantas [imunidade desencadeada por PAMP (PTI)]. O PTI também pode ser desencadeado por produtos de degradação da parede celular da planta que resultam da ação de enzimas degradativas secretadas pelo sistema SST2. O sistema SST3 é o responsável pela translocação de proteínas efetoras para a célula hospedeira é essencial para a patogenicidade bacteriana. Proteínas efetoras de *Xanthomonas spp.* com localização e/ou função conhecidas na planta e parceiros de interação de plantas identificados são mostrados. Os efetores do SST3, membros da família TALE/AvrBs3/PthA modulam a expressão gênica do hospedeiro. O efector AvrBs4/PthA4 é o fator de virulência mais importante para o desenvolvimento da hiperplasia dos tecidos (Hu et al., 2014). As proteases de cisteína previstas XopD e membros da família YopJ/AvrRxv presumivelmente removem SUMO de proteínas alvo de plantas e/ou suprimem a deposição de calosidades na parede celular da planta. IM, membrana interna; OM, membrana externa; CW, parede celular; PM, membrana plasmática. Fonte: extraído de Büttner e Bonas, 2012. p. 7

Figura 3. Representação dos sistemas de secreção em *Xanthomonas spp.* Seis tipos de sistemas de secreção são codificados, o SST2 e o SST5 dependem da via Sac ou TAT para o transporte de proteínas através da membrana interna da célula. Os sistemas SST3, SST4 e SST6 estão associados a formação do pilus extracelular e à entrega de proteínas de virulência para o interior das células do hospedeiro, entretanto, apenas a translocação para o SST3 é conhecida. OMV: formação de

vesículas da membrana externa; IM: Membrana interna; OM: Membrana externa; TAT, translocação “Twin-arginine”. Fonte: Büttner e Bonas (2010). p. 11

Figura 4. Modo de ação das LTs. As LTs clivam as ligações glicosídicas entre os ácidos N-acetilglicosamina (NAM) e N-acetilmurâmico (NAG), formando como produto muropeptídeos contendo uma ligação 1,6-anidro no resíduo de ácido murâmico (1,6-anidromurâmico). Este resíduo é reenviado para o citoplasma via proteína de membrana AmpG, desreprimindo AmpR e ativando a expressão de lactamases (AmpC). Na figura: LT: transglicosilase lítica de mureína; Inner membrane: membrana interna; Outer membrane: membrana externa; Periplasm: periplasma; Cytoplasm: citoplasma; Extracellular space: espaço extracelular. Fonte (Dik et al., 2017)..... p. 14

Figura 5. Classificação das LTs. As LTs foram classificadas de acordo com a presença de domínios, e provável função. Fonte: Dik et al. (2017)..... p. 18

Figura 6. Diagrama do desenho de oligonucleotídeos. (A) Representação da construção do mutante $\Delta XAC_RS16355$ por deleção. As setas com letras A, B, C e D representam os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos AB e CD com tamanhos de 237 pb e 624 pb respectivamente. O fragmento AD apresenta um tamanho de 2143 pb e a versão AD deletada (sem o gene *XAC_RS16355*) um tamanho de 861 pb. **(B)** Representação da construção do mutante $\Delta XAC_RS22275$ por deleção. As setas com letras A, B, C e D representam os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos AB e CD com tamanhos de 181 pb e 198 pb respectivamente. O fragmento AD apresenta um tamanho de 1100 pb e a versão AD deletada um tamanho de 369 pb. p. 25

Figura 7. Mapa do vetor suicida pNPTS138. Para obtenção do mutante $\Delta XAC_RS16355$ foram utilizadas as endonucleases *NheI* e *HindIII* (Fonte: CAPELETTI, 2010)..... p. 25

Figura 8. Géis de eletroforese em agarose (1%) corado com brometo de etídio (10 mg/mL), visualizados em Fotodocumentador CHEMIDOC MP BIO-RAD. M: marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas). Mutante $\Delta mltB2.1$: (C1) gene

mltB2.2 2100 pb; (C2) gene *mltB2.1*, 1200 pb; (1) gene *mltB2.2*, 1278 pb; (2) gene *mltB2.1* nocauteado ($\Delta mlb2.1$), com 369 pb; Mutante $\Delta mlb2.2$: (C1) gene *mltB2.1*, 2100 pb; (C2) gene *mltB2.1*, 1200 pb; (3) gene *mltB2.2* nocauteado ($\Delta mlb2.2$), 1000 pb; (4) gene *mltB2.1*, 1200 pb; Mutante duplo $\Delta mlb2.1-\Delta mlb2.2$: (C1) gene *mltB2.1*, 2100 pb; (C2) gene *mltB2.1*, 2 pb; (5) gene *mltB2.2* nocauteado ($\Delta mlb2.1$, 1000pb); (6) gene *mltB2.1* nocauteado ($\Delta mlb2.1$), 369 pb..... p. 44

Figura 9. Teste de patogenicidade por infiltração. Sintomas observados no 1°, 3°, 7°, 9°, 12° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e mutante $\Delta mlb2.1$ na superfície adaxial (folhas superiores no quadro) e abaxial (folhas inferiores no quadro) de folhas jovens de Laranja “Pêra Rio”. As duas linhagens bacterianas foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC/mL. p. 46

Figura 10. Teste de patogenicidade por infiltração. Sintomas observados no 1°, 3°, 7°, 9°, 12° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e o mutante $\Delta mlb2.2$ na superfície adaxial (folhas superiores no quadro) e abaxial (folhas inferiores no quadro) de folhas jovens de Laranja “Pêra Rio”. As duas linhagens bacterianas foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC/mL. p. 47

Figura 11. Teste de patogenicidade por infiltração. Sintomas observados no 1°, 3°, 7°, 9°, 12° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e o mutante $\Delta mlb2.1-\Delta mlb2.2$ na superfície adaxial (folhas superiores no quadro) e abaxial (folhas inferiores no quadro) de folhas jovens de Laranja “Pêra Rio”. As duas linhagens bacterianas foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC/mL. ...
..... p. 48

Figura 12. Ensaio de aspersão. Sintomas observados no 21° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mlb2.1$, $\Delta mlb2.2$ e $\Delta mlb2.1-\Delta mlb2.2$ na superfície adaxial e abaxial de folhas jovens de Laranja “Pêra Rio”. As linhagens bacterianas foram aspergidas na concentração de 10^8 UFC/mL. p. 49

Figura 13. Curvas de crescimento *ex planta* e *in planta*. (A) Curva de crescimento *ex planta* realizada por 48 horas entre as linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ em meio de cultura rico NB. (B) Curva de crescimento *in planta* realizado em concentração de 10^6 UFC/mL para as linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ em folhas de Laranja “Pêra Rio”. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão..... p. 50

Figura 14. Ensaio de formação de biofilme. O teste de formação de biofilme foi realizado das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ em meio rico NB (A) e em meio mínimo XVM2 (B), em tubos de vidro tipo borossilicato. O experimento foi realizado com quatro réplicas biológicas e cinco réplicas técnicas para cada amostra. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão..... p. 53

Figura 15. Ensaio de agregação celular. O ensaio de agregação celular foi realizado para a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ no período de 24 horas. O teste foi realizado em 5 réplicas biológicas e 2 réplicas técnicas para cada amostra. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão..... p. 54

Figura 16. Produção de goma xantana. Relação da produção de goma/biomassa para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$. O teste foi realizado em 3 réplicas biológicas. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão..... p. 55

Figura 17. Motilidade bacteriana. (A) Motilidade “swimming” realizada em meio semi-sólido (0,3% de ágar) para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$. (B) Motilidade “swarming” realizada em meio semi-sólido (0,7% ágar) para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$. O teste foi realizado em 5 réplicas biológicas e 5 réplicas técnicas para cada isolado. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão..... p. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de domínios encontrados nas LTs. p. 17

Tabela 2. Cepas bacterianas utilizadas para a obtenção dos mutantes da ORF *XAC_RS16355*, pela técnica de mutagênese sítio dirigida. p. 22

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante da ORF *XAC_RS16355*. p. 24

Tabela 4. A. Oligonucleotídeos específicos para diferenciar as ORFs *XAC_RS16355* e *XAC_RS22275*; **B.** Oligonucleotídeos específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306. **C.** Oligonucleotídeos utilizados para identificar sequências do vetor pNPTS138. p. 32

Tabela 5. Diversidade de LTs encontradas no genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e plasmídeo pXAC64. Classificação e nomes de genes propostos e papel em XccA (para um alinhamento detalhado e análise de domínio, consulte a Apêndice C). p. 41

Tabela 6. LTs associadas ao SST3 em patógenos de plantas e animais. p. 67

1 INTRODUÇÃO

As *Xanthomonadaceae* são um dos maiores e mais importantes grupos de fitopatógenos Gram-negativos. Um destes patógenos, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (XccA) é o agente causal do cancro cítrico (CC) do tipo A, uma das principais doenças que afetam a citricultura (Graham et al., 2004).

A interação entre XccA-hospedeiro depende da expressão de diversos genes, tanto pela bactéria, como pelo hospedeiro (Jalan et al., 2013), sendo os diferentes sistemas de secreção bacterianos considerados como um dos mais relevantes para o processo de desenvolvimento do CC (Jalan et al., 2013). O Sistema de secreção tipo 3 (SST3) apresenta papel fundamental na patogenicidade de XccA, sendo um mecanismo bacteriano que media interações entre patógeno e hospedeiro. Este sistema é essencial para a virulência bacteriana e tem como finalidade a exportação de proteínas efectoras (Buttner e Bonas, 2010). As proteínas secretadas pelo patógeno são responsáveis por modular diversas funções biológicas, como expressão gênica, progressão do ciclo celular, supressão das respostas de defesa da planta e sequestro da maquinaria celular responsável pela multiplicação desordenada das células do hospedeiro, funções bioquímicas, processos fundamentais para a penetração e estabelecimento do patógeno e conseqüentemente o desenvolvimento da doença (Buttner e Bonas, 2010).

Para ocorrer a formação e instalação do SST3, é necessário que ocorra a síntese, remodelagem e degradação de parede celular da bactéria, sendo as transglicosilases líticas de mureína (LT) as enzimas responsáveis pela clivagem do peptidoglicano e em seguida, seu remodelamento (Holtje, 1998; Dik et al., 2017). Além das LTs estarem relacionadas com a montagem dos sistemas de secreção tipo 3 e 4, também podem desempenhar diversas outras funções celulares como, por exemplo, expansão da parede celular durante o crescimento bacteriano, rearranjo da parede celular para montagem de flagelos, possuindo ainda papel na conjugação bacteriana, além de reciclagem de muropeptídeos e lise da parede celular permitindo processos de esporulação e germinação em bactérias Gram-positivas (Dik et al., 2017). De acordo com a provável função e distribuição de domínios, as LTs podem ser classificadas em 6 famílias (Dik et al., 2017). No entanto, o mecanismo de ação de

diversas LTs ainda é desconhecido (Dik et al., 2017). Além disso, diversos genomas depositados nos bancos de dados públicos não apresentam anotação concisa de suas LTs. Portanto, a função e diversidade das LTs encontradas em micro-organismos procariotos ainda não é totalmente elucidada.

A XccA apresenta poucas informações sobre seu arsenal de LTs, logo pouco se sabe sobre a diversidade e provável papel destas enzimas nesta bactéria. Estudos anteriores investigaram a função da LT *XAC_RS22275* presente no plasmídeo pXAC64 de XccA por técnicas de genômica funcional, sugerindo correlação com o processo de interação XccA-citros (Laia et al., 2009). O gene *XAC_RS22275* possui uma cópia paróloga presente no genoma cromossomal, *XAC_RS16355*, apresentando 99% de identidade com a cópia plasmidial. Estudos utilizando mutação sítio dirigida da ORF *XAC_RS22275* mostraram redução dos sintomas do CC (Ferreira, 2014), suportando a importância destes genes para o desenvolvimento do CC. A análise de secretoma realizada em meio mínimo indutor XAM1 mostrou uma super expressão dessas duas ORFs (Ferreira et al., 2016), corroborando com a hipótese de que este gene está envolvido na relação patógeno-hospedeiro. Ambas as cópias são genes passageiros do transposon *TnXax1* pertencente à família Tn3, que é composto por uma transposase (*tnpA*), resolvase (*tnpS*) e recombinase (*tnpT*), sendo que a cópia *TnXax1* do cromossomo contém as proteínas efetoras do T3SS: XopE3 e XopAI, enquanto a cópia *TnXax1* do plasmídeo contém o efector XopE2 (Ferreira et al., 2015). Estudos anteriores indicam que o elemento *TnXax1* é conservado em *Xanthomonadales* e preponderante para evolução e emergência da patogenicidade desta ordem (Ferreira et al., 2015; Gochez et al., 2018).

Portanto, as LTs estão diretamente relacionadas ao metabolismo do peptidoglicano por diversos mecanismos, no entanto sua relação com patogenicidade em XccA não é totalmente compreendida. Desta forma, o estudo funcional e *in-silico* dessas proteínas poderá lançar luz sobre a provável relação com o CC e virulência em XccA.

Neste trabalho foi realizada a identificação, anotação e estudo genômico comparativo das LTs presentes em XccA. A técnica de mutação sítio-dirigida foi utilizada na LT *XAC_RS16355*, para gerar um mutante simples e um mutante duplo, utilizando o mutante já existente para a *XAC_RS22275* e cedido para este estudo. A técnica de mutação sítio-dirigida permite o estudo funcional das LTs constituintes do

transposon *TnXax1*, e também investigação da possível relação da transferência lateral com o processo de virulência e interação planta-patógeno. Também foi avaliado se as LTs constituintes do transposon *TnXax1* estão diretamente relacionadas a fatores de virulência, como formação de biofilme, agregação celular, goma xantana e motilidade bacteriana, uma vez que estes são essenciais para a virulência total da *XccA*.

Os resultados sugerem que as LTs identificadas em *XccA* apresentam função relacionada a diferentes etapas do metabolismo do peptidoglicano com a remodelagem da parede celular para inserção de sistemas de secreção tipo 3, 4 e 6, inserção de flagelo, divisão e reciclagem da parede celular e degradação e controle da produção do peptidoglicano. Em adição, foi observado que as LTs associadas ao *TnXax1* não são essenciais para o desenvolvimento do CC, porém, estão relacionadas com o aumento da virulência da *XccA*, diminuição de biofilme, agregação e aumento da produção de goma xantana. Estes resultados corroboram com o provável papel do elemento *TnXax1* como agente propagador da virulência e patogenicidade em *XccA*, e sugerem também que a aquisição destas LTs pelo mecanismo de transferência lateral, mediado pelo elemento *TnXax1*, influenciou o *fitness* bacteriano, trazendo vantagens adaptativas para a bactéria durante o processo de interação planta-patógeno em *XccA*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Xanthomonas citri* subsp *citri* 306 A e o cancro cítrico

O agente etiológico do cancro cítrico tipo A (CC) é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A (XccA), fitopatógeno Gram-negativo, aeróbio obrigatório, possui metabolismo oxidativo, não fixa nitrogênio, uniflagelar e não produz esporos (HAYWARD, 1993). Em 2002 seu genoma foi sequenciado, revelando um cromossomo circular de 5,17 Mbp e dois plasmídeos epissomais pXAC64 (64,920 bp) e pXAC33 (33,699 bp) (Da Silva et al., 2002).

O cancro cítrico tipo A (CC) é uma doença endêmica em muitas partes do mundo, levando a impactos econômicos severos na indústria produtora de citros (Da Silva et al., 2002; Brunings e Gabriel, 2003). Dentre os impactos econômicos da doença têm destaque a restrição da comercialização da produção para áreas livres da doença por ser uma doença quarentenária e a depreciação, queda dos frutos pela presença de lesões e desfolha de plantas (Fundo de defesa da citricultura, 2014). Alguns métodos para controle da doença utilizando cobre são conhecidos, mas levam ao aumento da resistência da bactéria em plantas susceptíveis (Li et al., 2011a) e não têm se mostrado eficientes a longo prazo. Diante disso, uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados pela XccA durante o processo infeccioso poderia ajudar a desenvolver estratégias para combater este patógeno.

A disseminação da bactéria pode ocorrer pelas chuvas com ventos, equipamentos de colheita contaminados, movimentação de pessoas que trabalham no campo, movimentação e exposição de plantas infectadas, tornando difícil a erradicação da doença (FERENCE et al., 2017). O CC se desenvolve em folhas, ramos e frutos, é caracterizado pela formação de lesões circulares, e encharcamento dos tecidos (“water soaking”), podendo sofrer erupção, tomando forma semelhante a bolhas, que posteriormente se transformam em pústulas esponjosas, brancas ou amarelas, que escurecem e engrossam com o decorrer do tempo, ficando de cor castanho claro e áspero ao toque (Figura 1). Em árvores infectadas, o CC pode levar a desfolha e queda prematura dos frutos (Brunings e Gabriel, 2003).

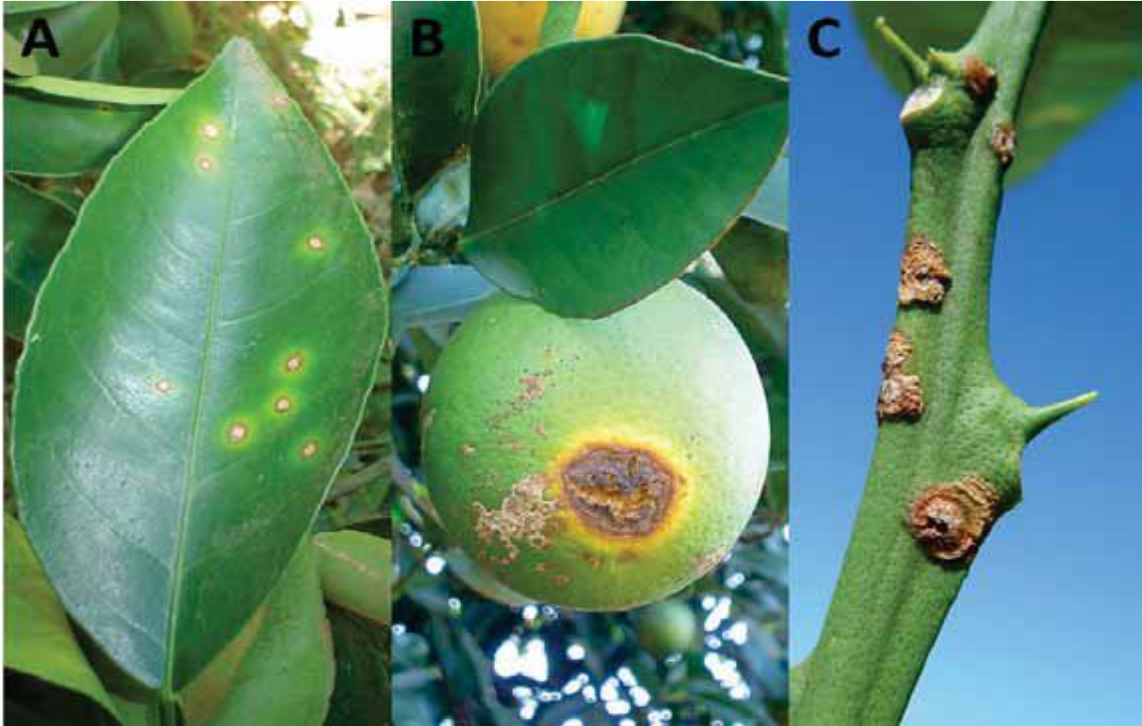


Figura 1. (A) CC observado em folhas, (B) fruto e (C) ramo de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Nas folhas e fruto está presente o halo amarelo característico ao redor das lesões. Fonte: Fundecitrus, 2018.

Para se estabelecer com sucesso em plantas hospedeiras, os patógenos devem ser capazes de aderir à superfície da planta, invadir o espaço intercelular do tecido hospedeiro, adquirir nutrientes para sobreviver e neutralizar as respostas de defesa das plantas (Graham et al., 2004). O repertório de fatores de virulência utilizados pela XccA inclui a secreção de polissacarídeos, enzimas de degradação de parede celular, fatores detoxificantes, efetores, adesinas, sistemas de secreção e fatores de sinais difusíveis (DSF) mediados por “quorum sensing” (QS) (Figura 2) (Da Silva et al., 2002).

As adesinas são proteínas que estão relacionadas à adesão das bactérias a superfície do hospedeiro, fazem a mediação entre a ligação bacteriana a múltiplos receptores da célula hospedeira e contribuem para diferentes fases do processo de infecção (Das et al., 2009). Os exopolissacarídeos (EPS ou goma xantana), polímero de unidades pentassacarídicas repetidas, uma cadeia principal de celulose e cadeias laterais de trissacarídeos são comercialmente usados como um agente espessante em indústrias nutricionais e farmacêuticas (Becker et al., 1998). Em XccA, o grupamento de 12 genes *gum* é o responsável pela biossíntese do polímero (Brunings e Gabriel, 2003). A xantana tem sido relatada como um importante fator de virulência

indispensável para os estágios iniciais do CC (Facincani et al., 2014) relacionada a fixação da bactéria no hospedeiro, proteção às tensões ambientais e também contribui para o desenvolvimento de sintomas do CC (Rigano et al., 2007). Além disso, é sugerido que os EPSs são a maior parte do biofilme maduro (Costerton et al., 1995).

Os biofilmes são aglomerados de células em uma matriz de polissacarídeos extracelulares (EPSs) (Costerton et al., 1995), juntamente com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Li e Wang, 2012). Quando agrupadas dessa forma podem favorecer a troca de material genético por mecanismos de transferência gênica horizontal entre os micro-organismos presentes, favorecendo a diversidade das populações. Além disso o biofilme pode proporcionar proteção ao estresse ambiental, sendo considerado um mecanismo de defesa às respostas do hospedeiro e antimicrobianos (Costerton et al., 1995; Branda et al., 2005). Juntamente com o EPS, os lipopolissacarídeos (LPS) são componentes do biofilme maduro, e da membrana externa da bactéria, atuando na proteção contra ambientes hostis (Raetz e Whitfield, 2002). Também atuam contra os “PAMPs” (“Pathogen-associated molecular patterns”), padrões de moléculas reconhecidas pelas células do sistema imune inato da planta, sendo detectados por receptores específicos do hospedeiro (Dow et al., 2000). Logo, biofilmes, goma xantana e LPSs são fatores de virulência importantes para o reconhecimento e sobrevivência da bactéria, sendo também, associados ao desenvolvimento do CC. Os fatores de virulência da XccA também podem estar relacionados às proteínas secretadas por sistemas de secreção, como o tipo 2 (SST2) e 3 (SST3) (Figura 2). O SST2 é o principal sistema que medeia o transporte de proteínas do periplasma bacteriano para o meio extracelular, tais quais: toxinas e enzimas extracelulares, como proteases, lipases e enzimas que degradam a parede celular da planta, contribuindo diretamente na interação hospedeiro-patógeno (Ryan et al., 2011). O SST3 está relacionado à translocação de efetores diretamente no citosol das células do hospedeiro, modulando as respostas de defesa e contribuindo para a multiplicação bacteriana (Deng et al., 2017).

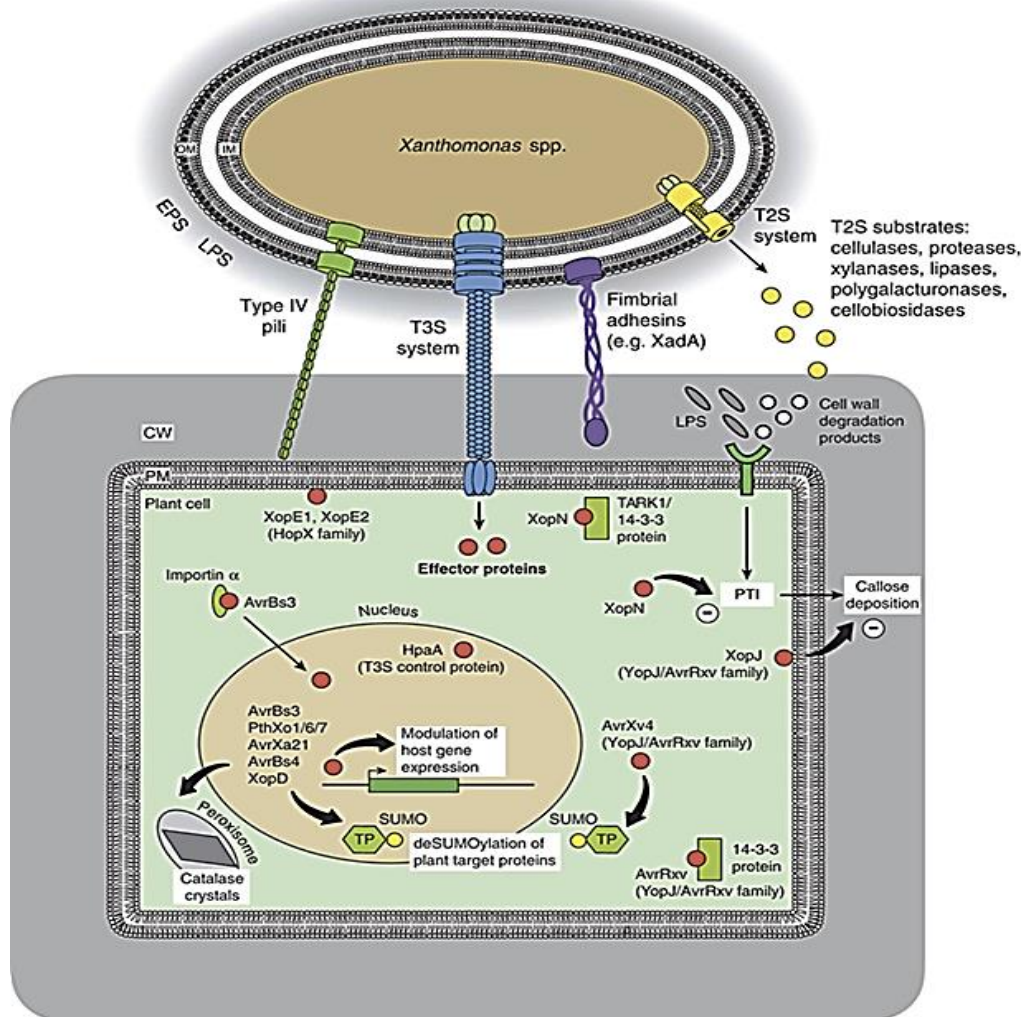


Figura 2. Fatores de virulência conhecidos em *Xanthomonas*. *Xanthomonas spp.* dependem dos sistemas SST2 e SST3, adesinas, EPS e lipopolissacarídeos (LPS) para interagir com sucesso com suas plantas hospedeiras. O LPS pode ser liberado da superfície bacteriana e demonstrar respostas de defesa da planta. LPS e outros PAMPs são presumivelmente detectados por receptores específicos de plantas que ativam as respostas de defesa das plantas [imunidade desencadeada por PAMP (PTI)]. O PTI também pode ser desencadeado por produtos de degradação da parede celular da planta que resultam da ação de enzimas degradativas secretadas pelo sistema SST2. O sistema SST3 é o responsável pela translocação de proteínas efetoras para a célula hospedeira é essencial para a patogenicidade bacteriana. Proteínas efetoras de *Xanthomonas spp.* com localização e/ou função conhecidas na planta e parceiros de interação de plantas identificados são mostrados. Os efetores do SST3, membros da família TALE/AvrBs3/PthA modulam a expressão gênica do hospedeiro. O efector AvrBs4/PthA4 é o fator de virulência mais importante para o desenvolvimento da hiperplasia dos tecidos (Hu et al., 2014). As proteases de cisteína previstas XopD e membros da família YopJ/AvrRxx presumivelmente removem SUMO de proteínas alvo de plantas e/ou suprimem a deposição de calosidades na parede celular da planta. IM, membrana interna; OM, membrana externa; CW, parede celular; PM, membrana plasmática. Fonte: extraído de Büttner e Bonas, 2012.

2.2 A importância da transferência gênica horizontal para a diversidade genética em *Xanthomonadales*

Em relação aos eucariotos, os genomas bacterianos são compactos e apresentam principalmente genes associados a funções básicas do organismo, como reprodução e sobrevivência (Monteiro-Vitorello et al., 2005). Estas funções caracterizam a porção estável do genoma, comumente utilizada para delinear a história evolutiva de um micro-organismo (Liu et al., 1999). Para sobreviver, a diferentes habitats e colonizar diferentes hospedeiros, as bactérias precisam se adaptar rapidamente às constantes mudanças ambientais. Para isso, o mecanismo de transferência gênica horizontal (TGH) realiza o intercâmbio de material genético entre as diferentes bactérias permitindo que as bactérias diversifiquem seu arsenal genético e, conseqüentemente, agreguem novas características que melhorem sua adaptação (Sieber et al., 2017). Os elementos genéticos móveis, como: transposons, integrons, plasmídeos e profagos provenientes de bacteriófagos temperados, são os responsáveis pela transferência de genes associados à interação patógeno-hospedeiro e genes de adaptação ou patogenicidade (Frost et al., 2005).

O gênero *Xanthomonas* é reconhecido por apresentar genoma com configurações em mosaico (Ryan et al., 2011), devido aos rearranjos genômicos envolvendo ilhas genômicas, sequências de inserção (“IS”-“insertion sequences”) (Lima et al., 2005; Monteiro-Vitorello et al., 2005) e inserções de profagos (Varani et al., 2013). Os elementos “IS” são transposons procarióticos muito simples, variando de 0,8 a 3,5 Kb, e devido ao processo de mobilização podem gerar rearranjos genômicos, inversões e deleções, que podem resultar na modificação de regiões promotoras, formação de pseudogenes e modificações do conteúdo gênico. Portanto, atuam diretamente na diversificação do repertório genético de sua espécie hospedeira, uma vez que podem contribuir para a aquisição de genes favoráveis às respostas adaptativas das bactérias ao ambiente, e também que possam contribuir para o seu metabolismo.

Algumas estruturas genéticas do tipo cassete de inserção móvel (“MICs” - “mobile insertion cassettes”) são derivadas de “ISs”, possuem sequências curtas (100 pb) de inversões repetidas (“IR”), e embora não codifiquem suas próprias transposases, podem ser ativados por um mecanismo cognato (Siguier et al., 2012)

possibilitando sua disseminação tal qual um transposon. Alguns efetores do SST3, têm sido associados à “MICs” como genes passageiros, podendo ser disseminados por TGH e atribuindo novas características adaptativas para o organismo (Ferreira et al., 2015).

O transposon *TnXax1* foi caracterizado recentemente em *Xanthomonas* indicando que os eventos de transposição são determinantes para a evolução e emergência da patogenicidade neste gênero (Ferreira et al., 2015). O elemento *TnXax1* carrega diferentes conjuntos de genes passageiros, tais como os genes TALEs/AvrBs/PthA (“TALE” - “transcription activator–like effector”), efetores do SST3 relacionados com a modulação das respostas do hospedeiro em favor do patógeno (Boch e Bonas, 2010). Em *Xanthomonas* alguns “MICs” são flanqueados pelas mesmas “IRs” do elemento *TnXax1*, possibilitando sua disseminação por transferência lateral por todas as *Xanthomonas* (Boch e Bonas, 2010). Portanto, a presença de elementos transponíveis possibilita a disseminação de patogenicidade e virulência por todo o gênero *Xanthomonadales*. Tal fato foi observado na cepa *X. citri*-03-1638-1-1, que apresenta um plasmídeo híbrido de 99Kb, quatro TALEs e um “operon” que confere resistência ao cobre, resultante da recombinação entre o elemento *TnXax1* presente nos plasmídeos pXAC33 e pXAC64 (Gochez et al., 2018). Estes resultados corroboram a hipótese de que o elemento *TnXax1* é conservado na ordem *Xanthomonadales* e apresenta papel preponderante para evolução e emergência da patogenicidade deste gênero (Ferreira et al., 2015; Gochez et al., 2018).

Em *XccA*, o elemento *TnXax1* apresenta-se duplicado, sendo uma cópia presente no plasmídeo pXAC64, composto por uma transposase (*tnpA*), resolvase (*tnpS*) e recombinase (*tnpT*), a LT *XAC_RS22275* e o efector *XopE2*. A outra cópia está no cromossomo da bactéria e contém a LT *XAC_RS16355* e as proteínas efetoras do T3SS: *XopE3* e *XopAI* (Moreira et al., 2010). Assim como os efetores identificados (*XopE2*, *XopE3* e *XopAI*), as LTs *XAC_RS22275* e *XAC_RS16355* são genes passageiros do transposon *TnXax1*, e embora não sejam um efector do SST3 (Pothier et al., 2011), já foi sugerido como importante para a instalação e atividade deste aparato (Laia et al., 2009). Estes genes estão conservados em diversas *Xanthomonas*, sugerindo que uma pressão seletiva está atuando para mantê-los dentro dos transposons (Ferreira et al., 2015). O gene *XAC_RS22275* apresenta 63% de identidade com *HopAJ1* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, que

apesar de não ser um substrato do SST3, tem sido sugerido que HopAJ1 é secretada para o periplasma bacteriano, onde atua na quebra do peptidoglicano permitindo a montagem do SST3 contribuindo para a entrega de proteínas efetoras em células hospedeiras (Oh et al., 2007). Em estudos anteriores foi averiguado que a deleção da LT XAC_RS22275 está relacionada com a diminuição dos sintomas de necrose do CC (Laia et al., 2009). Em adição, outros estudos também sugeriram que as LTs presentes no TnXax1 apresentem papel na interação XccA-citros, demonstrada por análise de proteômica em meio mínimo indutor XAM1 (Ferreira et al., 2016). Estes resultados sugerem que estes genes são conservados em *Xanthomonas*, apresentando papel fundamental para a virulência e patogenicidade.

2.3 O sistema de secreção tipo 3: SST3

No curso da evolução biológica, as bactérias desenvolveram sete mecanismos para exportar vários fatores de virulência através das membranas celulares (Sistemas de secreção do tipo 1 ao 7) (Costa et al., 2015), sendo o Sistema de Secreção tipo 3 (SST3) um dos mais estudados (Deng et al., 2017). O SST3 consiste em um complexo proteico contendo um "pilus" extracelular, com formato semelhante a uma "agulha", e os translocadores formam poros nas membranas da célula hospedeira; diante disso, assume-se que as proteínas são secretadas através do SST3 na célula hospedeira em um modelo de injeção direta (Cornelis, 2000; Galan et al., 2014).

Este sistema é encontrado em diversos organismos patogênicos, por exemplo: *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) (Deng et al., 2017) e considerados a chave da patogenicidade em plantas e bactérias (Ghosh, 2004). O SST3 é composto de duas partes distintas (Figura 3), uma estrutura extracelular oca alongada, denominada "agulha" em patógenos de animais e "pilus Hrp" em fitopatógenos; uma base cilíndrica, que atravessa as duas membranas bacterianas e garante a estabilidade de toda a estrutura no envelope celular. Uma estrutura adicional projetada da membrana interna para o citosol bacteriano, o aparato exportador (Cornelis, 2000; Tampakaki et al., 2004), análoga a um complexo citoplasmático flagelar composto de ATPase e outras proteínas, que poderiam corresponder ao anel C flagelar (Tampakaki et al., 2004).

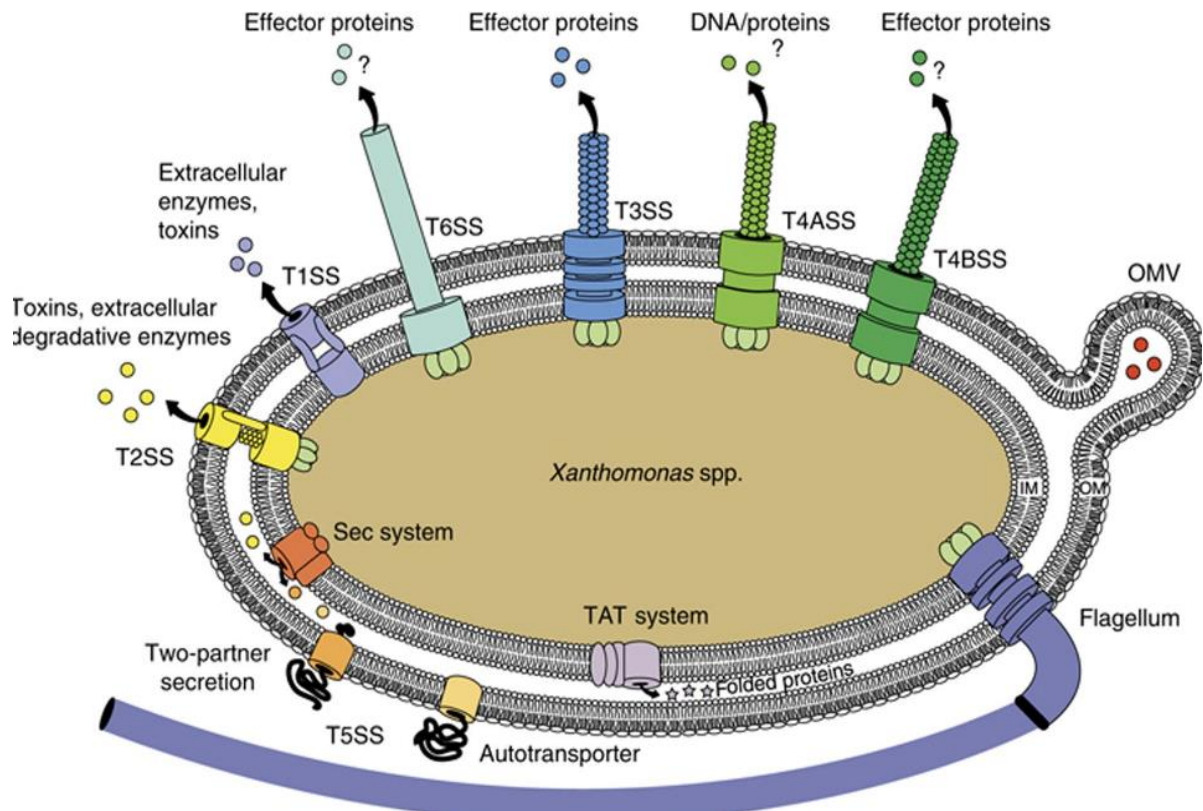


Figura 3. Representação dos sistemas de secreção em *Xanthomonas spp.* Seis tipos de sistemas de secreção são codificados, o SST2 e o SST5 dependem da via Sac ou TAT para o transporte de proteínas através da membrana interna da célula. Os sistemas SST3, SST4 e SST6 estão associados a formação do pilus extracelular e à entrega de proteínas de virulência para o interior das células do hospedeiro, entretanto, apenas a translocação para o SST3 é conhecida. OMV: formação de vesículas da membrana externa; IM: Membrana interna; OM: Membrana externa; TAT, translocação "Twin-arginine". Fonte: Büttner e Bonas (2010).

A secreção de proteínas efetoras apresenta papel fundamental durante a interação planta-patógeno e são responsáveis por modular diversas funções biológicas (Jalan, 2014). Sua principal função é modificar os processos biológicos do hospedeiro favorecendo o crescimento do patógeno, e ao mesmo tempo promover o desenvolvimento da doença e supressão das respostas de defesa (Jalan, 2014; Pfeilmeier et al., 2016; Ference et al., 2017). As proteínas efetoras variam entre os organismos, e conseqüentemente nos sintomas e severidade de diversas doenças (Tampakaki et al., 2004). Nas *Xanthomonas*, o SST3 e as proteínas efetoras são consideradas a chave da patogenicidade (Ghosh, 2004). Já foram identificados 24 efetores/candidatos a efetores em *XccA*; 30 em *X. campestris* pv. *vesicatoria* 85-10; 32 em *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (Buttner, 2012).

Os efetores da família TALE/AvrBs/PthA estão distribuídos por todo o gênero *Xanthomonas*, sendo que algumas espécies apresentam apenas uma ou várias dezenas de TALEs. São uma classe estruturalmente e funcionalmente distinta de proteínas de patógenos de plantas que são injetadas através do SST3 em células vegetais. Uma vez na célula vegetal, eles são direcionados para o núcleo, ligam-se às sequências de DNA específicas a cada TALE e modulam a expressão dos genes a jusante. A interação patógeno-hospedeiro selecionou os TALEs que ativam genes do hospedeiro relacionados a colonização e disseminação bacteriana. A pressão da doença, por sua vez, selecionou as adaptações de plantas que montam a defesa em resposta aos TALEs. Assim, os TALEs podem ser fatores de virulência ou fatores de "avirulência" reconhecidos por um ou ambos os membros da interação (Bonas et al., 1989; Bogdanove et al., 2010).

2.3.1. A montagem e instalação do SST3 no envelope bacteriano

A montagem do corpo basal e também das outras estruturas do SST3 envolvem uma hierarquia de expressão (Deng et al., 2017). A instalação do SST3 no envelope bacteriano também está associada a enzimas de degradação de peptidoglicano, as transglicosilases líticas de mureína (LTs) (Koraimann, 2003; Zahrl et al., 2005; Scheurwater et al., 2008), uma vez que os poros naturais da parede celular são poucos e muito estreitos para permitir a montagem de sistemas complexos, como o SST3, SST4, SST6 e o flagelo (Koraimann, 2003; Buttner, 2012; Deng et al., 2017; Dik et al., 2017). Além disso, outro fato que chama a atenção para as LTs é que elas estão presentes na maioria das bactérias Gram-negativas que contêm peptidoglicano, sendo consideradas um novo e importante alvo para o desenvolvimento de novas drogas antibacterianas (Dik et al., 2017).

As LTs podem ser associadas diretamente a componentes dos sistemas de secreção de proteínas, como já mostrado para VirB1 nos sistemas de secreção do tipo 4 (SST4) de *Agrobacterium tumefaciens* e *Brucella suis* (Draper et al., 2006). VirB1 é uma proteína codificada pelo agrupamento gênico do SST4, relacionada a lise do peptidoglicano para montagem da estrutura do aparato no envelope celular e interação planta-patógeno (Buttner, 2012), tendo atividade de transglicosilase lítica de mureína (Zahrl et al., 2005). Estudos realizados com estas enzimas mostram que sua

ausência pode tanto influir na patogenicidade/virulência do organismo, realçando o papel das LTs na dinâmica celular (Buttner, 2012).

No entanto, a anotação precisa das LTs em bancos de dados públicos como o “NCBI” (“National Center for Biotechnology Information” - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) é incompleta, uma vez que estas proteínas não estão corretamente classificadas (Apêndice A). Além disso, pouco se sabe sobre a função e mecanismo destas proteínas nos diversos micro-organismos conhecidos. Portanto, o papel e diversidade das LTs encontradas em micro-organismos procariotos ainda não é totalmente elucidada. Diante disso, a caracterização destas proteínas é de suma importância, tanto para a compreensão do papel biológico destas proteínas para os micro-organismos, quanto para maior compreensão do processo de interação patógeno-hospedeiro.

2.4 Transglicosilases líticas de mureína: LTs

A biossíntese de peptidoglicano é um processo fundamental e garante a viabilidade celular, explorado como alvo para o desenvolvimento de antibióticos, por exemplo vancomicina e β -lactâmicos (Fair e Tor, 2014). O peptidoglicano é um heteropolímero constituído por polissacarídeos que contém resíduos alternados de N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico associados por uma ligação β -1,4. É componente da parede celular de micro-organismos procariotos apresentando papel estrutural e fundamental para: a manutenção celular, forma, resistência às pressões de turgor interna e garantia da manutenção e integridade da parede celular (Lovering et al., 2012). O peptidoglicano não é uma estrutura estática, sendo continuamente expandido, degradado e rearranjado para criar aberturas pontuais para a inserção de flagelos e/ou poros para alguns sistemas de secreção bacterianos, sendo estes processos realizados pelas transglicosilases líticas de mureína (LTs) (Holtje et al., 1975).

As LTs são proteínas que apresentam de 150 a 750 aminoácidos, com atividade catalítica relacionada com a fragmentação do polissacarídeo do peptidoglicano na ligação glicosídica entre os ácidos N-acetilglicosamina (NAM) e ácido N-acetilmurâmico (NAG), através de uma ciclização intramolecular da porção N-acetilglicosamil. Durante esse processo, ocorre a formação de muropeptídeos

contendo uma ligação 1,6-anidro no resíduo de ácido murâmico (1,6-anidromurâmico) (Holtje, 1998), utilizado no metabolismo do peptidoglicano (Jacobs et al., 1994) (Figura 4).

Os muropeptídeos formados durante a reação das LTs são reenviados para o citoplasma via proteína de membrana AmpG, desreprimindo AmpR e ativando a expressão de lactamases (AmpC) (Lee et al., 2013). Nesse sentido, as LTs são estudadas quanto a sua utilização como antimicrobianos de duas formas: um inibidor de LT pode suprimir a capacidade de bactérias Gram-negativas de induzir β -lactamases, proteínas de resistência natural; a inibição de uma LT pode ainda colaborar/cooperar com a inibição de proteínas indutoras de penicilina (PBPs) garantindo o efeito bactericida do antibiótico (Jacobs et al., 1994)

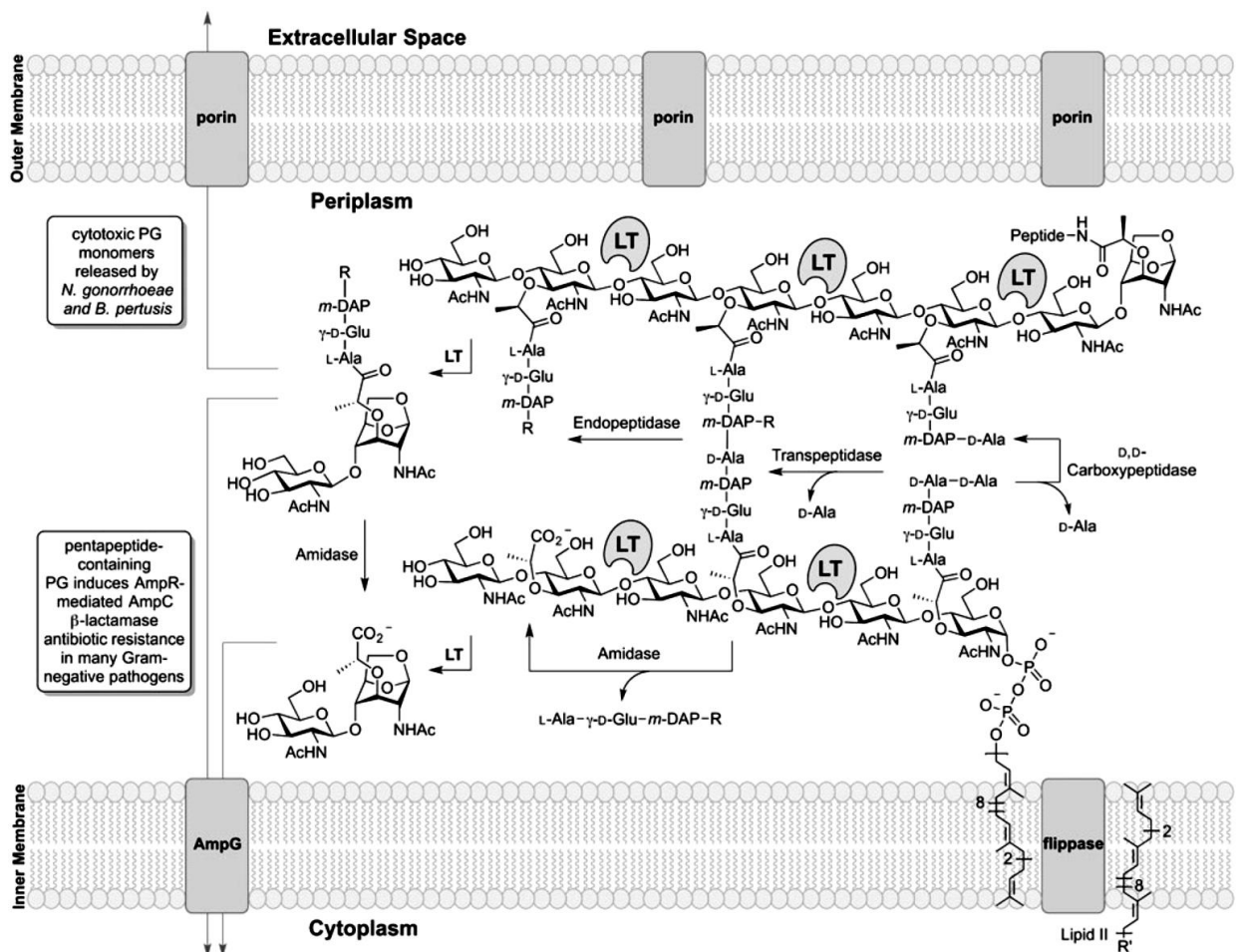


Figura 4. Modo de ação das LTs. As LTs clivam as ligações glicosídicas entre os ácidos N-acetilglucosamina (NAM) e N-acilmurâmico (NAG), formando como produto muropeptídeos contendo uma ligação 1,6-anidro no resíduo de ácido murâmico (1,6-anidromurâmico). Este resíduo é reenviado para o citoplasma via proteína de membrana AmpG, desreprimindo AmpR e ativando a expressão de lactamases

(AmpC). Na figura: LT: transglicosilase lítica de mureína; Inner membrane: membrana interna; Outer membrane: membrana externa; Periplasm: periplasma; Cytoplasm: citoplasma; Extracellular space: espaço extracelular. Fonte (Dik et al., 2017).

As LTs são agrupadas em uma superfamília de proteínas e com base na similaridade de sequências pôde-se identificar os motivos proteicos, presença ou ausência de domínios específicos que permitiram sua classificação e divisão em Famílias e subfamílias (Tabela 1) (Blackburn e Clarke, 2001; Dik et al., 2017; Herlihey e Clarke, 2017). Em organismos Gram-negativos apresentam-se em 6 Famílias e subfamílias (1: 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H; 2: 2A; 3: 3A, 3B; 4: 4A; 5: 5A; 6: 6A) e em organismos Gram-positivos, apresentam-se em duas Famílias e uma subfamília (1A, 1B e 2A) (Dik et al., 2017). Neste caso, será discutido e analisado as famílias dos organismos Gram-negativos.

As LTs estão amplamente distribuídas em organismos procariotos, e em alguns é possível identificar um diverso arsenal de LTs de diferentes famílias (Figura 5). Por exemplo, *E. coli* é atualmente conhecida por codificar 10 LTs de diferentes famílias: 1A (Slt70), 1B (MltC), 1C (MltE), 1D (MltD), 1E (MltF), 2A (MltA), 3A (MltB), 5A (MltG), 6A (RlpA) e nenhuma LT da Família 4 (Blackburn e Clarke, 2001; Dik et al., 2017), já o patógeno oportunisto *Pseudomonas aeruginosa* também apresenta 10 LTs: 1A (Slt), 1D (MltD), 1E (MltF e MltF2), 2A (MltA), 3A (MltB1), 3B (SltB2 e SltB3), 5A (MltG), 6A (RlpA) e nenhuma LT da Família 4.

Para investigar se este número de LTs está relacionado a processos celulares essenciais ou se apresentam redundância funcional, foram construídos mutantes para 6 LTs de *E. coli* (*slt70*, *mltA-E*) e observou-se que tanto as deleções individuais, quanto as múltiplas deleções comprometeram a clivagem do septo durante a divisão celular, resultando em cadeias celulares e aumento da permeabilidade da membrana externa, no entanto, nenhum efeito letal foi observado, sugerindo redundância funcional entre as LTs (Heidrich et al., 2002). Essa redundância funcional entre as LTs já foi comparada às proteínas de ligação à penicilina (PBPs) responsáveis pelos estágios finais da biossíntese do peptidoglicano, portanto, assim como os PBPs, a redundância funcional entre as LTs permite a eliminação de uma ou mais LT sem provocar um efeito letal (Blackburn e Clarke, 2001; Heidrich et al., 2002; Scheurwater et al., 2008). Em adição a esses resultados, têm-se sugerido que algumas das funções das LTs são essenciais para a bactéria e que não é possível nocautear todas as LTs (Scheurwater et al., 2008).

As LTs são consideradas enzimas autolíticas devido a capacidade de causar lise celular completa caso sua atividade ocorra de maneira desordenada. Adicionando a esse fato a abundância de LTs que um organismo apresenta, tem sido sugerido um controle específico destas proteínas por modificação química do substrato e um controle físico secundário, relacionado a formação de complexos com proteínas PBPs e interação física das LTs com proteínas de montagem de diversos sistemas de secreção (Scheurwater et al., 2008). No entanto, faltam respostas-chave em relação a estrutura, mecanismo e função da LTs.

Até o momento sabe-se que as LTs estão envolvidas em diversas funções celulares, por exemplo: expansão da parede celular durante o crescimento bacteriano, divisão do septo para permitir a separação de células filhas, rearranjo da parede celular para inserção de flagelos e sistemas de secreção tipo 3 e 4, conjugação bacteriana, reciclagem da parede celular (resistência), biossíntese, degradação e rearranjo do peptidoglicano, virulência e integridade celular e também atua regulando o alongamento das cadeias do peptidoglicano. Em organismos Gram-positivos estão envolvidas na lise da parede celular, permitindo os processos de germinação e esporulação (Dik et al., 2017).

O conhecimento do papel das transglicosilases pode auxiliar na compreensão de diversas enfermidades, inclusive o CC. Em adição, as LTs apresentam-se conservadas em diversos micro-organismos, podendo ser um potencial alvo para desenvolvimento de drogas antimicrobianas.

Tabela 1. Relação de domínios encontrados nas LTs.

Domínio	Função (InterproScan) (Finn et al., 2017)
SLT (IPR008258)	Relacionado com proteínas codificadas por bacteriófagos e sistema de secreção tipo 2, 3 e 4. Este domínio apresenta atividade de clivagem da ligação glicosídica β -1,4 entre ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, com a formação concomitante de uma ligação 1,6-anidro no resíduo de ácido murâmico.
LysM (IPR018392)	Função relacionada a ligação ao peptidoglicano e de interações planta-patógeno.
DUF3393 (IPR023664)	Função desconhecida, relacionada a degradação de mureína durante a reciclagem de muropeptídeos durante o alongamento celular e/ou divisão celular.
SBP_bac_3 (IPR001638)	Envolvido no transporte ativo de solutos através da membrana citoplasmática.
PG_binding_1 (IPR002477)	Relacionado com a ligação ao peptidoglicano.
MltA (IPR034654)	Auxilia na ligação ao peptidoglicano.
3D (IPR034654)	Composto por três resíduos conservados de ácido aspártico, presumidamente relacionados com atividade de peptidase.
SLT_2 (IPR031304)	Função relacionada ao domínio SLT.
Phage_lysozyme (IPR023347)	Propriedade de quebrar o peptidoglicano, hidrolizando as ligações 1,4-beta entre N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico em heteropolímeros.
YceG (IPR003770)	Relacionado com término da polimerização do peptidoglicano pela quebra endolítica de cadeias nascentes.
DPBB_1 (IPR007112)	Relacionado a proteínas de membrana externa e especificidade para peptidoglicano.

SPOR (IPR007730)

Relacionado tanto com a divisão celular e morfogênese, e processos de esporulação.

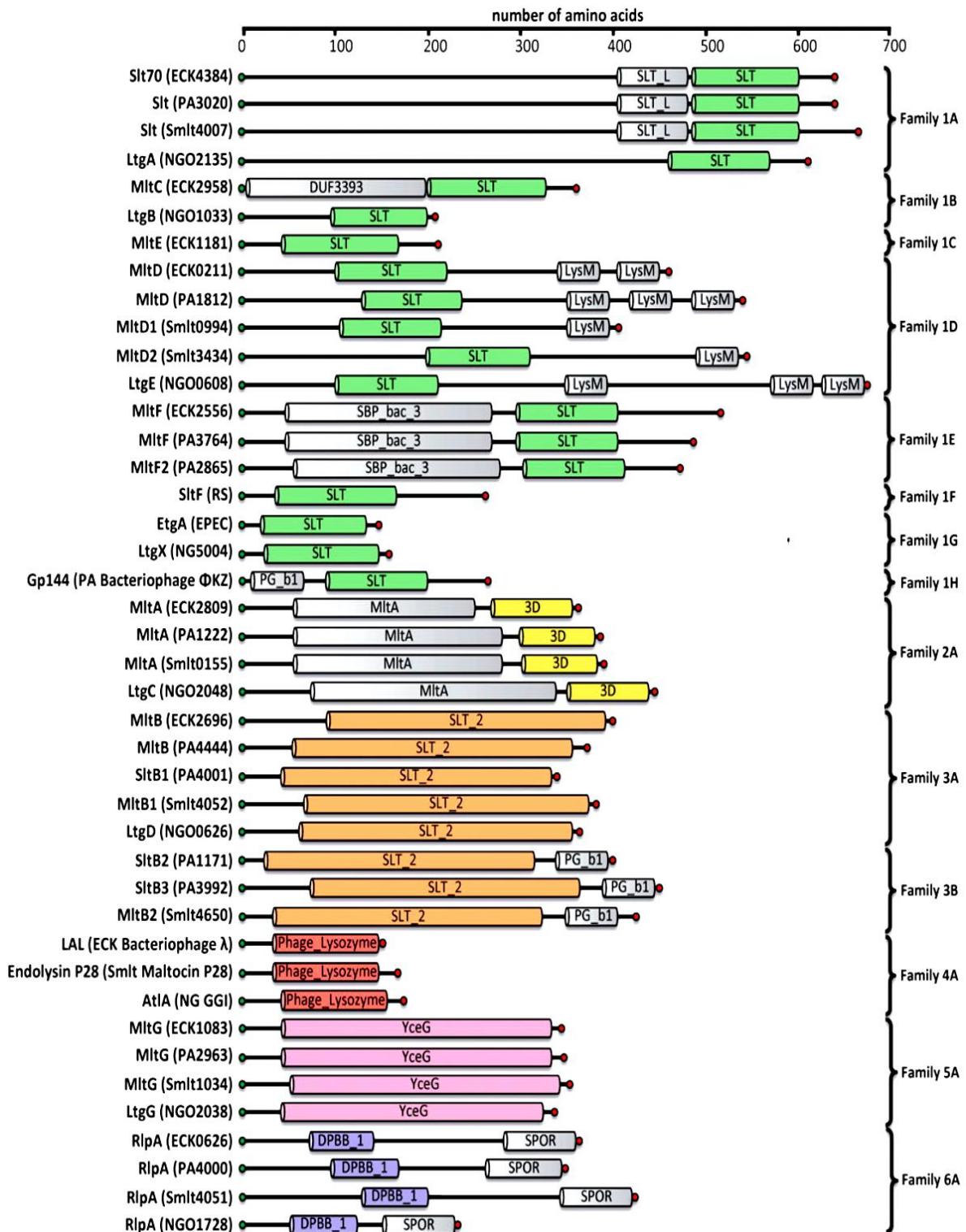


Figura 5. Classificação das LTs. As LTs foram classificadas de acordo com a presença de domínios, e provável função. Fonte: DIK *et al.* (2017).

2.4.1. As LTs e sua contribuição para a patogenicidade e virulência em *XccA*

As LTs não contribuem significativamente para o SST3 e virulência, devido a redundância funcional que estas proteínas apresentam (Zahrl et al., 2005; Buttner et al., 2007; Oh et al., 2007; Garcia-Gomez et al., 2011). Embora não haja uma relação direta entre as LTs e os SST3, SST4 e SST6, sabe-se que há pelo menos um gene dessa classe para cada sistema (Koraimann, 2003).

Em *XccA*, duas LTs (*XAC_RS22275* e *XAC_RS16355*) são genes passageiros do transposon *TnXax1*, elemento importante para a disseminação de patogenicidade e virulência por todo o gênero (Ferreira et al., 2015). Um estudo de mutagênese por inserção aleatória utilizando o transposon *Tn5* gerou uma biblioteca com aproximadamente 10.000 mutantes viáveis, dentre estes o mutante “18D5”, cuja ORF *XAC_RS22275* foi truncada. O mutante foi inoculado na variedade suscetível lima ácida ‘Galego’ e apresentou redução dos sintomas de necrose quando comparados aos da estirpe selvagem *XccA*. Este resultado sugeriu que o nocaute na proteína *XAC_RS22275* apresenta correlação com o processo de interação patógeno-hospedeiro (Laia et al., 2009). O gene *XAC_RS22275* foi novamente nocauteado utilizando a técnica de mutação sítio-dirigida, apresentando diminuição dos sintomas de necrose e hiperplasia em hospedeiro susceptível Laranja “Pêra Rio”, confirmando a importância desta LT para a virulência e patogenicidade da bactéria (Ferreira, 2014). Ambos os genes, *XAC_RS22275* e *XAC_RS16355*, foram detectados em experimento de secretoma utilizando meio mínimo indutor de virulência XAM1, indicando relação com a interação *XccA*-citros (Ferreira et al., 2016).

O gene *XAC_RS22275* está localizado no plasmídeo pXAC64, enquanto o gene *XAC_RS16355* encontra-se no cromossomo de *XccA*, apresentam 99% de similaridade e apenas uma troca no aminoácido Ser por Ala na posição 51. Ambas as cópias possuem peptídeo sinal de 27 aminoácidos (aa) e provavelmente função enzimática, logo, tem sido sugerido que as LTs *XAC_RS22275* e *XAC_RS16355* são secretadas para o periplasma, onde atuam na remodelagem do peptidoglicano, facilitando a montagem do SST3 e contribuindo indiretamente para a translocação de efetores (Noël L. ; Thieme F.; Nennstiel D. ; Bonas, 2002; Oh et al., 2007).

De acordo com a literatura, as LTs estão amplamente distribuídas nos organismos procariotos, no entanto, cada organismo apresenta um arsenal de LTs individual. Ressaltamos a abundância e diversidade destas proteínas em processos celulares básicos relacionados ao metabolismo do peptidoglicano por diversos mecanismos, a resistência a antimicrobianos e virulência e patogenicidade, o que as torna atrativas para novas propostas de estudo. Além de contribuírem para a compreensão do processo infeccioso entre patógeno-hospedeiro, o estudo das LTs pode esclarecer questões básicas da ciência, podendo ser aplicada a todos os micro-organismos.

Os dados apresentados na literatura reforçam a hipótese que as LTs *XAC_RS16355* e *XAC_RS22275* estão relacionadas a patogenicidade e virulência em *XccA*, corroborando com a hipótese que uma pressão seletiva está operando para preservar as LTs dentro do transposon *TnXax1* em *Xanthomonas* (Ferreira et al., 2015; Gochez et al., 2018). No entanto, não se sabe o provável papel celular de todos estes genes, e todos os dados envolvendo genômica funcional estão relacionados apenas ao gene *XAC_RS22275*, portanto, não se sabe se os genes atuam independentemente, se atuam em conjunto ou se apenas uma das cópias é expressa e supre a função da outra.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Identificação e análise *in silico* das proteínas transglicosilases em *Xanthomonas citri*.

A busca por proteínas transglicosilases foi realizada utilizando como fonte a base de dados “Genbank” do “The National Center for Biotechnology Information – NCBI” através da ferramenta “Blast” (Altschul et al., 1997), e classificadas a partir da proposta de DIK e colaboradores (2017), com uso da ferramenta “InterProScan” (Finn et al., 2017). O alinhamento das sequências foi realizado utilizando a ferramenta “ClustalX” (Larkin et al., 2007).

3.2 Linhagens bacterianas, meios de cultura e cultivo de células

Para este trabalho foram utilizados o isolado 306 da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A(XccA) (Da Silva et al., 2002) e o mutante $\Delta XAC_RS22275$ (Ferreira, 2014), obtidos no Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Departamento de Tecnologia da FCAV/UNESP, onde encontravam-se armazenados a -80°C .

As bibliotecas de “Shotgun”, “Cosmídeos” e DNA genômico foram obtidas da biblioteca de *Xanthomonas* (Da Silva et al., 2002) e utilizadas para obtenção das ORF (“Open reading frame”) *XAC_RS16355*. O material encontrava-se disponível no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da FCAV/UNESP, armazenado a -80°C .

Os meios de cultura utilizados para o cultivo bacteriano de XccA e mutantes foram: meio de cultura NB (5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de carne, 15 g/L de ágar e água destilada q.s.p. 1000 mL), e com adição de ágar (NA), NA com adição de sacarose 5%, XVM2 (20 mM NaCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 0,16 mM KH_2PO_4 , 0,32 mM K_2HPO_4 , 0,01 mM FeSO_4 , 10 mM frutose, 10 mM sacarose, 0,03% casaminoácidos, pH 6.7) suplementado com 1% w/v de glicose, meio goma (25g/L glicose; 3g/L extrato de levedura; 2g/L K_2HPO_4 ; 0,1g/L MgSO_4 , pH 7), LB para motilidade “swimming” (10 g/L triptona, 5 g/L NaCl, 3%) e LB para motilidade “swarming” (10 g/L triptona, 5 g/L NaCl, 7% ágar). Para o cultivo de *Escherichia coli* DH10B (*E. coli*) foram usados meio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L extrato de levedura,

10 g/L de NaCl, 15 g/L de ágar quando o meio for sólido, q.s.p 1000 mL). Quando necessário, foram adicionados aos meios de cultura os seguintes antibióticos: canamicina (50 µg/mL), ampicilina (50 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL) (Tabela 2).

Quando necessário uma alíquota dos isolados foi espalhada em placa de Petri, dentro da cabine de fluxo laminar, com meio de cultura apropriado. Para *E. coli* foi utilizado o meio LB contendo antibiótico quando necessário, a 37°C e 24 horas em estufa, e para *XccA*, utilizou-se NA/NB a 29°C durante 72 horas em BOD.

Tabela 2. Cepas bacterianas utilizadas para a obtenção dos mutantes da ORF *XAC_RS16355*, pela técnica de mutagênese sítio dirigida.

Cepa bacteriana	Características	Referência
<i>XccA</i>	Estirpe selvagem	(Da Silva et al., 2002)
$\Delta XAC_RS22275/\Delta mltB2.1$	Mutante ORF <i>XAC_RS22275</i> *	(Ferreira, 2014)
$\Delta XAC_RS16355/\Delta mltB2.2$	Mutante ORF <i>XAC_RS16355</i> *	Este trabalho
$\Delta XAC_RS22275-\Delta XAC_RS16355/\Delta mltB1.1-\Delta mltB2.2$	Mutante das ORFs <i>XAC_RS22275</i> e <i>XAC_RS16355</i>	Este trabalho
<i>E. coli DH5α λpir</i>	E44, $\Delta lacU169$ $\phi lac\Delta M15$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , λ pir phage lysogen	Biomedal
<i>E. coli SM λpir</i>	<i>Km^r</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr</i> , <i>leu</i> , <i>tonA</i> , <i>lacY</i> , sup	Biomedal
<i>E. coli DH10B</i>	Δ (<i>mcrA</i> , <i>mcrBC</i> , <i>mrr</i> , <i>A1</i> and <i>hsdRMS</i>), <i>pir+</i> , <i>lacZ</i> para screening	Invitrogen
Cosmídeo 1HB01	<i>Amp^r</i> ; Utilizado para obtenção da ORF <i>XAC_RS16355</i>	LBM
pNPTS138	Vetor suicida, <i>Km^r</i> , <i>Cl^r</i>	(Cappelletti, 2010)
pNPTS138- $\Delta XAC_RS16355/\Delta mltB2.2$	Mutante ORF <i>XAC_RS16355</i>	Este estudo

*As ORFs estão redigidas conforme nova anotação do genoma de *XccA* presente no banco de dados NCBI.

Antibióticos: Canamicina (*Km^r*); Ampicilina (*Amp^r*), cloranfenicol (*Cl^r*)

Anotação antiga: *XAC_RS22275*=*XACb0007*; *XAC_RS16355*=*XAC3225*.

3.3 Mutação na ORF XAC_RS16355

A técnica de clonagem por homologia foi realizada de acordo com Lee et al. (2004), utilizando o vetor suicida pNPTS138 (Figura 7). A mutação sítio-dirigida por “PCR de extensão por sobreposição” (“site directed mutagenesis by PCR overlap extension”) é um método padrão para a obtenção de mutantes, tanto por inserção quanto por deleção de sequências de DNA. A técnica envolve substituição, inserção ou deleção de sequências de DNA, utilizando-se ou não endonuclease de restrição. Envolve ainda a geração de produtos de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) que se sobrepõem uns aos outros devido a presença de uma “cauda complementar” (Sn Ho, 1989). Para o evento de recombinação homóloga no DNA do hospedeiro foi utilizado o vetor pNPTS138, que resulta em um diploide para o gene de interesse, e a partir de um evento de *crossing-over* ocorre a eliminação do alelo selvagem, assim como do vetor suicida (Figura 7) (Kaniga, 1991).

Os oligonucleotídeos foram desenhados na região intergênica da ORF XAC_RS16355 e serão utilizados na obtenção do mutante simples, Δ XAC_RS16355 e do mutante duplo Δ XAC_RS22275- Δ XAC_RS16355 (Tabela 3). Dois pares de oligonucleotídeos, A-B e C-D foram utilizados neste trabalho. O oligonucleotídeo A foi desenhado na região “upstream”, com sítio de restrição para a endonuclease *NheI* (“Promega”) na extremidade 5’ e o oligonucleotídeo D, na região “downstream”, com o sítio para a endonuclease *HindIII* (“New England BioLabs Inc®”), também na extremidade 5’ (Tabela 3). Os oligonucleotídeos B e C foram delineados de forma a terem uma região complementar na extremidade 3’. Os oligonucleotídeos B e C foram delineados de forma a terem uma região complementar na extremidade 3’ (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante da ORF *XAC_RS16355*.

Nome do produto	Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	Enzima de restrição	Amplicon (pb)	Uso
AB	A (F)*	CATAGCTAGCGGTTTCGGTGACTACACCTTG	<i>NheI</i>	237	Mutação sítio dirigida ORF <i>XAC_RS16355</i>
	B (R)*	CATCCCCGAGAGATACCCGAGGTGGTG			
CD	C (F)*	GGGTATCTCTCGGGGATGTACGTCGGA	<i>HindIII</i>	624	
	D (R)*	GACGCTTTCTTCTGGCTGAAGCTTCTGT			
AD	A (F)*	CATAGCTAGCGGTTTCGGTGACTACACCTTG		861	
	D (R)*	GACGCTTTCTTCTGGCTGAAGCTTCTGT			

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

Em azul: enzimas de restrição: oligonucleotídeo A: *NheI*, oligonucleotídeo D: *HindIII*.

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

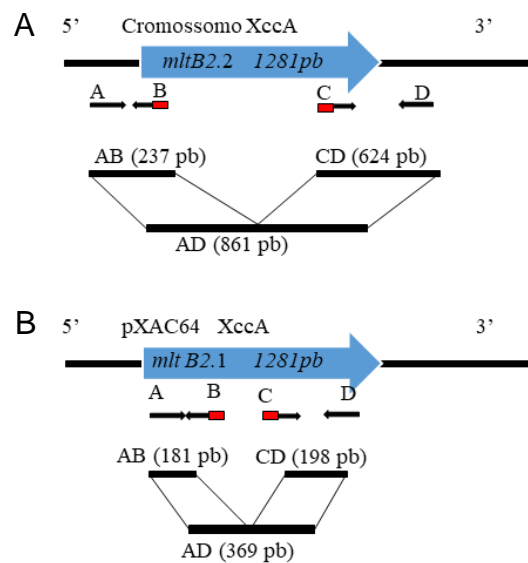


Figura 6. Diagrama do desenho de oligonucleotídeos. (A) Representação da construção do mutante $\Delta XAC_RS16355$ por deleção. As setas com letras A, B, C e D representam os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos AB e CD com tamanhos de 237 pb e 624 pb respectivamente. O fragmento AD apresenta um tamanho de 2143 pb e a versão AD deletada (sem o gene *XAC_RS16355*) um tamanho de 861 pb. **(B)** Representação da construção do mutante $\Delta XAC_RS22275$ por deleção. As setas com letras A, B, C e D representam os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos AB e CD com tamanhos de 181 pb e 198 pb respectivamente. O fragmento AD apresenta um tamanho de 1100 pb e a versão AD deletada um tamanho de 369 pb.

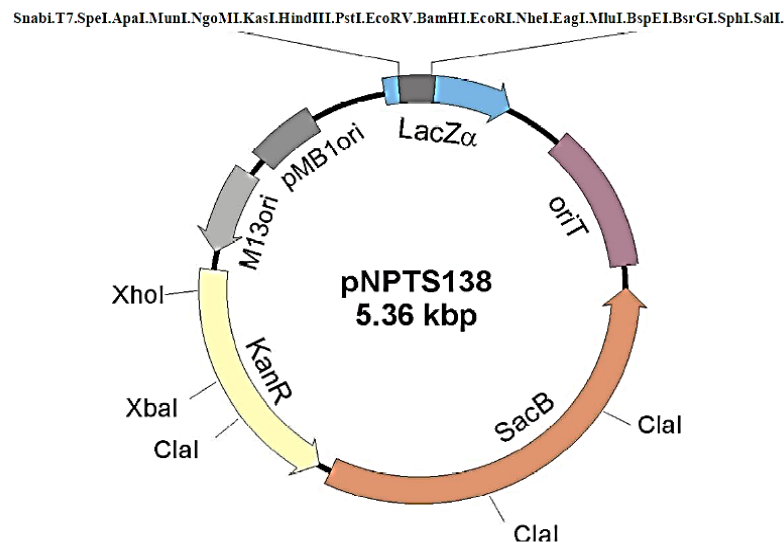


Figura 7. Mapa do vetor suicida pNPTS138. Para obtenção do mutante $\Delta XAC_RS16355$ foram utilizadas as endonucleases *NheI* e *HindIII* (Fonte: Capeletti, 2010).

3.3.1. Isolamento de DNA plasmidial contendo a ORF *XAC_RS16355*

O DNA plasmidial contendo a ORF *XAC_RS16355* e utilizado como molde (“template”) para as reações de PCR foi extraído de um clone da biblioteca de “Shotgun” de *XccA* presente no CREBIO (Da Silva et al., 2002). Os isolados foram cultivados em meio LB com adição de antibiótico necessário, incubados em BOD a 37°C por 16 horas. Para a extração, utilizou-se “Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (“Promega”), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro “NanoDrop®” ND-1000 (“Thermo Scientific”) a partir do valor da absorbância a 260 nm, considerando que valor de A₂₆₀ nm igual a 1,0 corresponde a uma solução de DNA com concentração igual a 50 µg/mL (Sambrook et al., 1989).

3.3.2. Obtenção do mutante $\Delta XAC_RS16355$

Os oligonucleotídeos A, B, C e D (Tabela 3, Figura 6) foram utilizados para a obtenção do mutante $\Delta XAC_RS16355$, utilizando como molde o DNA plasmidial do Cosmídeo 1HB01. O DNA foi extraído utilizando “Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (“Promega”) seguindo as instruções do fabricante e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro “NanoDrop®” ND-1000 (“Thermo Scientific”) a partir do valor da absorbância A 260 nm (Sambrook et al., 1989). Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos, A-B, C-D. Duas primeiras reações de PCR independentes foram feitas com os oligonucleotídeos A-B e C-D, gerando os fragmentos AB e CD, respectivamente. Estes produtos foram utilizados como molde para amplificação por PCR com os oligonucleotídeos A-D, resultando num único fragmento AD (Condições para as reações estão no Apêndice B). Uma representação esquemática da estratégia utilizada para a obtenção do mutante nocaute $\Delta XAC_RS16355$ é apresentada na Figura 6.

Posteriormente, o fragmento AD e o vetor suicida pNPTS138 foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição *NheI* (Promega) e *HindIII* (“New England BioLabs Inc®”) e ligados com a enzima T4 Ligase (“New England BioLabs Inc®”), seguindo instruções dos fabricantes (condições no Apêndice B). O produto da ligação (pNPTS138- $\Delta XAC_RS16355$) foi utilizado para transformação em células quimicamente competentes de *E. coli* DH10B.

3.4 Subclonagem em *E. coli* DH10B

3.4.1. Preparação de células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B

As células quimicamente competentes de *E. coli* DH10B foram preparadas segundo o protocolo de Sambrook et al. (1989) com algumas modificações. Para tanto, foi plaqueada uma amostra da estirpe em meio LB sólido, sendo incubadas em BOD por 16 horas a 37 °C em estufa. Posteriormente, uma colônia isolada de cada amostra foi transferida para 5 mL de meio LB líquido e mantidas sob agitação a 200 rpm em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker”, a 37 °C, por 16 horas (pré-inóculo). Em seguida, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para um frasco tipo Erlenmeyer de 2 L contendo 300 mL de meio LB líquido (inóculo), sendo os frascos mantidos sob agitação a 200 rpm em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker”, até a obtenção de uma densidade óptica Abs 600 nm entre 0,4 e 0,6 (aproximadamente 3 horas).

Após obtenção da DO desejada, o inóculo foi mantido em banho de água e gelo durante 15 min. Em seguida, cada inóculo foi distribuído em seis tubos tipo “Falcon” de 50 mL previamente mantidos em gelo e centrifugados a 4 °C, 3040 g em centrífuga “Hettich Zentrifugen Rotina 46R”, por 12 min, sendo o sobrenadante descartado ao final da centrifugação. O precipitado resultante de cada tubo foi ressuscitado com auxílio de uma pipeta, em 10 mL de uma solução estéril e gelada de cloreto de cálcio (CaCl₂) e glicerol (0,1 M; 20% de glicerol). Em seguida, a suspensão de bactérias foi centrifugada em centrífuga “Hettich Zentrifugen Rotina 46R”, nas mesmas condições descritas anteriormente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de cada tubo foi novamente ressuscitado com auxílio de pipeta em 1 mL de solução gelada de cloreto de cálcio e glicerol (0,1 M; 20% de glicerol) e a suspensão novamente centrifugada em centrífuga “Hettich Zentrifugen Rotina 46R”, como nas condições acima. O precipitado de todos os tubos foi ressuscitado com pipeta em um volume final de 2 mL em um único tubo. A suspensão de células alíquotadas em volumes de 50 µL, em microtubos tipo “Eppendorf”, os quais foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e conservados em ultrafreezer a -80 °C até o momento de uso.

3.4.2. Transformação do vetor pNPTS138- Δ XAC_RS16355 em células quimiocompetentes de *E. coli* DH10B

A transformação foi realizada de acordo com protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Para a transformação, foram utilizados 100 ng do vetor suicida contendo o fragmento AD nocauteado, água Milli-Q estéril (controle negativo) e 50 ng do vetor pUC19 (controle positivo). Os DNAs foram adicionados separadamente em microtubos de 1,5 mL contendo células de *E. coli* DH10B quimiocompetentes, mantidos em gelo, com a mistura sendo feita gentilmente com as mãos. Em seguida, as células foram mantidas em gelo por mais 20 min e, em então, transferidas para um banho-maria (“Mettler”) a 42 °C por 45 segundos, sendo retornadas ao gelo imediatamente e nele mantidas por mais 2 min. Estas células foram recuperadas mediante a adição de 950 μ L de meio LB líquido e incubação por 1,5 horas, a 37 °C em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker” sob agitação constante de 150 rpm. Ao final, 200 μ L das células foram plaqueadas em meio LB sólido com o antibiótico Canamicina a 50 ng/ μ L, e mantidas por 16 horas, a 37 °C, para seleção dos transformantes.

3.4.3. Seleção e confirmação das colônias

Para seleção das colônias foram utilizadas placas contendo meio LB sólido com o antibiótico canamicina 50 ng/ μ L, 0,1mM de IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) e 0,0032% de X-gal (5-bromo- 4-chloro- 3-indolyl- β -D-galactosidase), mantidas a 37°C em estufa. O vetor pNPTS138 é resistente a este antibiótico e a clonagem correta interrompe o gene Lac-Z pertencente ao vetor, dessa forma, pode-se fazer seleção de colônias por cores: colônias brancas são recombinantes, pois a clonagem interrompe o Lac-Z sendo incapaz de clivar X-gal, e as colônias azuis não contém o gene de interesse (Δ XAC_RS16355).

As colônias brancas selecionadas foram replicadas em placas de meio LB com Canamicina 50 ng/ μ L, incubadas por 24hr a 37°C em estufa, e uma massa de células (10 amostras) foi transferida para 50 mL de meio LB líquido, 16 horas a 37°C em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker”, para extração de DNA plasmidial. A extração foi feita com “Kit Wizard Genomic DNA Purification” (“Promega”), seguindo o protocolo do fabricante e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro

“NanoDrop®” ND-1000 (“Thermo Scientific”) a partir do valor da absorbância a 260 nm (Sambrook et al., 1989).

3.5 Transformação de células de XccA eletrocompetentes

Após confirmação do sequenciamento, o DNA plasmidial do vetor pNPTS138-*ΔmltB2.2* foi extraído com “Kit Wizard Genomic DNA Purification” (“Promega”), seguindo o protocolo do Kit, quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Scientific”) a partir do valor da absorbância a 260 nm (Sambrook et al., 1989) e posteriormente inserido por eletroporação (Do Amaral, 2005) em XccA e no mutante *ΔXAC_RS22275* (Ferreira, 2014).

Células eletrocompetentes de XccA e do mutante *ΔXAC_RS16355* foram preparadas de acordo com Amaral et al. (2005), com modificações. Para tanto, cultivou-se a XccA em meio NA por 48 horas, a 29°C em BOD. Uma colônia isolada foi transferida para 5 mL de meio NB, cultivado por 16 horas a 29°C em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker”, sob agitação constante de 180 rpm. Em seguida, 2 mL do cultivo foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio NB durante 16 horas, a 29°C em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker”, sob agitação constante de 180 rpm. Após o período de incubação, o cultivo foi dividido em 4 tubos tipo “Falcon” de 50 mL cada, centrifugados a 4040g em centrífuga “Hettich Zentrifugen Rotina 46R”, por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1mL de água Milli-Q estéril (2X autoclavada) com a pipeta, a temperatura ambiente. O pellet de dois tubos tipo “Falcon” foram transferidos para um só tubo, restando apenas dois tubos tipo “Falcon”, e estes foram completados para 50 mL com água Milli-Q estéril (2X autoclavada) (total 100 mL) a temperatura ambiente. Estes tubos foram centrifugados a 4040 g em centrífuga “Hettich Zentrifugen Rotina 46R”, por 15 minutos também a temperatura ambiente, e em seguida o sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido no meio restante (aproximadamente 1 mL) com a pipeta e divididos em tubos tipo “Eppendorf” (100 µL por tubo), a temperatura ambiente, sendo estes utilizados rapidamente.

Para a transformação, foram utilizados 3 µL de DNA do vetor pNPTS138-*ΔXAC_RS16355* (~1000 ng) e 3 µL de água Milli-Q estéril (controle negativo), que foram adicionados a 100 µL de células competentes e transferidos para uma cubeta

de eletroporação, com espessura de 2 mm (“BioRad”), a qual foi então submetida à eletroporação de pulso de 2.500 V durante 2,6 ms, no equipamento Gene “PulserXcell™ Total System” (“BioRad”). Após a eletroporação foi adicionado à solução 1 mL de meio NBY (0,8% NB, 0,2% de extrato de levedura, 0,2% de K₂HPO₄, 0,05% de KH₂PO₄, 0,25% de glicose, 1 M MgSO₄) suplementado com sacarose 20% e 10 mM MgSO₄. A solução foi transferida para um tubo tipo “Falcon” de 15 mL, o qual foi mantido por agitação em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker” por 4 horas, 29 °C a 140 rpm. Em seguida, 200 µL de cada suspensão foi plaqueada em meio NA contendo Canamicina (20 µg/ml) e incubada em BOD a 29°C por 72 horas, para seleção das colônias com o vetor pNPTS138- Δ XAC_RS16355.

Para o segundo evento de recombinação as colônias foram crescidas em 5 mL de meio NB, 16 horas a 29°C em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker”, sob agitação constante de 180 rpm. Em seguida as amostras foram diluídas na proporção 1:10, 1:100 e 1:1000 e 50 µL foram plaqueadas em meio cultivo NA com adição de sacarose 5% e incubadas em BOD por 24-48 horas. Nesse momento a troca do gene original pelo gene truncado já deve ter ocorrido pelo evento de recombinação homóloga, sendo as colônias que crescerem resistentes a sacarose e susceptíveis a Canamicina, devido a perda do vetor suicida. Estas foram selecionadas como candidatas à mutação sítio-dirigida para o mutante simples Δ XAC_RS16355 e duplo, Δ XAC_RS22275- Δ XAC_RS16355.

3.6 Confirmação da mutação em XccA

As confirmações dos mutantes foram realizadas por meio de PCRs de colônias (Apêndice B), sendo o DNA utilizado proveniente de 1 colônia da placa contendo sacarose 5%. Para tanto, utilizou-se um palito para pegar uma massa bacteriana e transferi-la para um tubo de PCR, adicionou-se 20 µL de um tampão de lise (50 mM KCl, 0,1% Tween 20, 10 mM tris HCl, pH 8.8), incubados em termociclador “GeneAmp® PCR System 9700”, durante 30 minutos a 99°C. Destes 4 µL foram utilizados como template para as reações de PCR de colônia, oligonucleotídeos A-D (condições no Material S1 e S3) e em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1%, revelados no “Fotodocumentador CHEMIDOC MP BIO-RAD”, para confirmar a mutação no gene XAC_RS16355. Foi realizada uma reação de PCR

utilizando 100 ng de cada mutante e oligonucleotídeos específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A (Xac01 e Xac02 – Tabela 4C) (Coletta-Filho et al., 2006). E ainda uma PCR utilizando 100 ng de DNA de cada mutante e oligonucleotídeos específicos para o vetor pNPTS138, cuja finalidade é verificar se houve outra integração do vetor no genoma de XccA (Tabela 4C). As reações de PCR sempre foram acompanhadas de uma reação contendo água Milli-Q no lugar do DNA para controle negativo das reações, e uma PCR com 100 ng de DNA genômico de XccA para controle positivo das reações (as condições destas últimas PCRs estão no Apêndice B).

Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial das colônias utilizando o “Kit Wizard Genomic DNA Purification” (“Promega”) seguindo instruções do fabricante e quantificadas em espectrofotômetro “NanoDrop®” ND-1000 (“Thermo Scientific”) a partir do valor da absorbância a 260 nm (Sambrook et al., 1989). Uma alíquota de 100 ng de DNA plasmidial foi utilizada para o sequenciamento na plataforma 3730xl “DNA analyser” (“Thermo Fisher Scientific”) (com os oligonucleotídeos “A”, “D_RS16355”; e “F_RS_22275” e “D_RS22275” (Tabela 4A), para confirmação do clone contendo a mutação na ORF XAC_RS16355. A comparação das sequências obtidas no sequenciamento com a sequência do genoma de XccA foi feita utilizando a ferramenta BLAST disponível no site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1997).

Tabela 4. A. Oligonucleotídeos específicos para diferenciar as ORFs *XAC_RS16355* e *XAC_RS22275*; **B.** Oligonucleotídeos específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306. **C.** Oligonucleotídeos utilizados para identificar sequências do vetor pNPTS138.

	Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	Amplicon (pb)
A	A (F)*	CATAGCTAGCGGTTCCGGTGACTACACCTTG	2100
	D_RS16355 (R)*	AAGGGGAGGCGCGTCCTCTTGGCG	
	F_RS22275 (F)*	GTGTGGATCCGGGCATTCTGACCGCCAT	1100
	D_RS22275 (R)*	TGGGGCCGATATCGATAAAAAAAGGAATCC	
B	Xac01	CGCCATCCCCACCACCACCACGAC	581
	Xac02	AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA	
C	M13 Foward -40**	GTTTTCCCAGTCACGAC	250
	M13 Reverse -48**	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	

* (F) Foward; (R) Reverse; Oligonucleotídeos sintetizados pela SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA.

**Oligonucleotídeos obtidos no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Unesp/FCAV.

3.7 Teste de patogenicidade por infiltração

O teste de patogenicidade *in planta* foi realizado para o isolado XccA, o mutante $\Delta XAC_RS22275$, o mutante $\Delta XAC_RS16355$ e o mutante duplo $\Delta XAC_RS22275\text{-}\Delta XAC_RS16355$ (Laia et al., 2009). Três colônias isoladas dos mutantes e XccA foram multiplicadas em meio NA durante 72 horas em BOD. A massa bacteriana de cada isolado foi transferida para um tubo tipo “Falcon” contendo 15 mL de meio NB, incubados a 29°C, 16 horas sob agitação a 180 rpm utilizando equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker”. Em seguida a densidade óptica foi avaliada (as amostras com leitura entre 0,5 e 0,8 foram utilizadas) e então os tubos foram centrifugados a 4.040 g em centrífuga “Hettich Zentrifugen Rotina46R”, 25°C por 12 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuscitado em 10 mL de água de torneira estéril, e a concentração foi ajustada até a densidade óptica Abs 600 nm igual a 0,3, equivalente a 10^8 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL). Em seguida, as suspensões bacterianas de XccA e dos mutantes foram inoculadas separadamente em 3 plantas e 3 folhas por planta, da variedade moderadamente resistente de Laranja “Pêra Rio” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) na face abaxial da folha. Ao lado direito da nervura central foram inoculados os mutantes, e o isolado XccA foi inoculada do lado

esquerdo da folha, sob as mesmas condições e concentrações, como controle positivo da doença. Também foi inoculado uma folha, com água estéril para controle em cada uma das plantas. As plantas foram mantidas sob as mesmas condições de temperatura, umidade, iluminação em laboratório e, após o terceiro dia, os sintomas foram observados até o 21º dia, com registro fotográfico.

3.8 Curva de crescimento bacteriano *ex planta*

A curva de crescimento *ex planta* foi realizada de acordo com (Lacerda et al., 2017) com modificações. A estirpe XccA, o mutante $\Delta XAC_RS22275$, o mutante $\Delta XAC_RS16355$ e o mutante duplo $\Delta XAC_RS22275-\Delta XAC_RS16355$ foram cultivadas em meio NA por 48 horas a 29°C em BOD. Uma colônia de cada linhagem foi cultivada em 20 mL de meio NB por 16 horas a 29°C sob agitação constante a 180 rpm em equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker”. Após crescimento a densidade óptica foi averiguada e foram utilizadas as culturas com com leitura entre 0,5 e 0,8, estas foram utilizadas e ajustadas para 0,1 a Abs 600 nm (inóculo), em um volume final de 1,5 mL e incubadas por 48 horas no equipamento “BioTek” (“Synergy H1”), sob agitação constante a temperatura de 29°C e com leituras a cada 30 minutos. Os gráficos foram feitos utilizando o software “Graphpad Prism” versão 6. Foram feitas réplicas técnicas (3 repetições) e biológicas (3 colônias).

3.9 Curva de crescimento bacteriano *in planta*

O teste foi feito de acordo com LAIA *et al.*, 2009, com modificações. A preparação dos inóculos foi realizada através da multiplicação de XccA, o mutante $\Delta XAC_RS22275$, o mutante $\Delta XAC_RS16355$ e o mutante duplo $\Delta XAC_RS22275-\Delta XAC_RS16355$ em meio NA durante 48/72h, 29°C em BOD, separadamente. Uma colônia isolada de cada estirpe foi transferida para um tubo tipo “Falcon” de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultivo NB e cultivados por 16 horas a 29°C em equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker”. Em seguida a densidade óptica foi avaliada (as amostras com leitura entre 0,5 e 0,8 foram utilizadas) e os cultivos foram centrifugados a 4.040 g em centrífuga “Hettich Zentrifugen Rotina46R” por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o pellet ressuspendido em 50 mL de PBS 1X (137 mM NaCl, 12 mM fosfato, 2.7 mM KCl, pH

7.4) estéril, padronizado a densidade óptica Abs 600 nm, igual a 0,3, correspondente a 10^8 UFC/mL, que em seguida foi ajustada por diluição seriada até 10^6 UFC/mL em um volume final de 50 mL. As suspensões bacterianas foram inoculadas em 4 pontos distintos de folhas de Laranja “Pêra Rio” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pela técnica de infiltração por seringa sem agulha.

Quatro discos com 1 cm^2 provenientes dos pontos de inoculação foram coletados nos tempos: 0, 1, 3, 6, 10 e 15 dias após a inoculação. Este procedimento foi realizado em todas as linhagens e nas três plantas (réplicas biológicas). Após coletado, cada disco foi macerado na presença de 1 mL de PBS 1X estéril. A cada tempo de coleta, 100 μL de cultura foram diluídos através de diluição seriada (10^{-1} até 10^{-15}) e 10 μL das amostras foram plaqueadas através de pipetagem em microgota, em triplicata (3 diferentes diluições para cada disco), em placas contendo meio de cultura sólido NA, sendo estas mantidas a 29°C em BOD por 48 horas para visualização e contagem das unidades formadoras de colônias.

3.10 Ensaio de aspersão *in planta*

O teste de aspersão foi realizado de acordo. Isolados de XccA, o mutante $\Delta\text{XAC_RS22275}$, o mutante $\Delta\text{XAC_RS16355}$ e o mutante duplo $\Delta\text{XAC_RS22275-}\Delta\text{XAC_RS16355}$ foram cultivados em meio NA por 48 horas em estufa. As colônias foram transferidas para um tubo tipo “Falcon” contendo 10 mL de meio NB e incubadas a 29°C sob agitação constante de 180 rpm em equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker”, durante 16 horas. Em seguida a densidade óptica foi avaliada (as amostras com leitura até 0,8 foram utilizadas) e o cultivo foi centrifugado em centrífuga a 4.040 g em centrífuga “Hettich Zentrifugen Rotina46R” por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em um tubo tipo “Falcon” contendo 50 mL de PBS 1X. A densidade óptica foi ajustada para 0,3 (Abs 600 nm) valor correspondente a 10^8 UFC/mL. A aspersão da suspensão bacteriana foi realizada em folhas jovens da variedade moderadamente resistente de Laranja “Pêra Rio” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) utilizando um borrifador, até o ponto de escorrimento. As plantas foram cobertas com saco translúcido por 24 horas, e após esse período o saco foi retirado, foi feito o acompanhamento dos sintomas e registro fotográfico no 21º dia após inoculação (Yan e Wang, 2011).

3.11 Ensaios de formação de biofilme

Os ensaios foram realizados em meio rico NB (Yan e Wang, 2011) e em meio definido indutor de virulência XVM2 suplementado com 1% w/v de glicose (Rigano et al., 2007). As linhagens de XccA, o mutante $\Delta XAC_RS22275$, do mutante $\Delta XAC_RS16355$ e do mutante duplo $\Delta XAC_RS22275-\Delta XAC_RS16355$ foram plaqueadas em meio de cultura sólido NA e mantidas a 29°C em BOD por 48 horas. Após este período, as células foram ressuspensas em meio de cultura líquido XVM2 acrescido de glicose 1% w/v e também meio NB a densidade óptica Abs 600 nm, igual a 0,3, correspondente a 10^8 UFC/mL, sendo 1 mL desta suspensão transferido para tubos de ensaio de vidro tipo borossilicato. Os tubos foram mantidos a 29°C por 96 horas sem agitação em BOD. O biofilme formado nos frascos foi visualizado através da coloração com 0,1% de violeta cristal e lavado uma vez com água ultrapura estéril. O corante remanescente nas células foi dissolvido em 1 mL de etanol-acetona (80:20) e quantificado através de espectrofotometria utilizando a Abs 595 nm com a utilização do leitor de microplacas “iMark™” (“Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA”). As médias de quatro repetições biológicas e cinco técnicas foram utilizadas para a comparação da produção de biofilme.

3.12 Ensaios de produção de goma xantana

A extração de goma xantana foi realizada de acordo com Shu e Yang (1990). A estirpe XccA, o mutante $\Delta XAC_RS22275$, o mutante $\Delta XAC_RS16355$ e o mutante duplo $\Delta XAC_RS22275-\Delta XAC_RS16355$ foram cultivados em meio de cultura sólido NA a 29 °C em BOD por 48 horas. Após este período, uma massa celular foi transferida para um tubo tipo “Falcon” contendo 10 mL de meio NB, mantidas a 29 °C, sob agitação constante de 180 rpm em equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker” por 16 horas. Em seguida a densidade óptica foi avaliada (as amostras com leitura até 0,8 foram utilizadas) e as amostras foram ajustadas para a densidade óptica Abs 600 nm, igual a 0,3, correspondente a 10^8 UFC/mL, através da adição de meio de cultura líquido NB fresco. Deste cultivo, 2,5 mL foram transferidos para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de meio goma, mantidos a 29 °C, sob agitação constante de 180 rpm em equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker” por 96 horas.

Após a incubação, os meios cultivados foram centrifugados por 40 minutos, a 4°C a 9.666 g em centrífuga “Hitachi” (“High-Speed Refrigerated Centrifuge CR 22GIII”), o sobrenadante foi transferido para béquers de 500 mL onde foi adicionado 4g de KCl, agitados por 15 minutos e em seguida adicionou-se o dobro do volume (200 mL) de etanol absoluto gelado. A solução foi homogeneizada com um bastão de vidro, e com o mesmo a goma precipitada foi retirada, transferida para potes de plástico e incubadas a 37 °C por 72 horas. O pellet remanescente no tubo da centrífuga foi ressuspendido com 1 mL de água bidestilada com auxílio de pipeta, a massa celular foi transferida para um béquer de 50 mL de vidro e incubada a 70 °C por 24 horas. Todas as extrações foram feitas com 3 amostras biológicas, os béquers foram pesados antes e depois de incubados, para obter a massa celular seca e a massa de goma seca produzida. As médias das amostras biológicas de cada estirpe e foram utilizadas para obtenção dos desvios padrão.

3.13 Ensaio de agregação celular

A estirpe XccA, o mutante $\Delta XAC_RS22275$, o mutante $\Delta XAC_RS16355$ e o mutante duplo $\Delta XAC_RS22275-\Delta XAC_RS16355$ foram cultivados em meio NA por 48/72 horas a 29°C em BOD. Cinco colônias isoladas foram crescidas separadamente em 25 mL de meio NB a 29°C em equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker” até que atingissem a densidade óptica Abs 600 nm de 2,0. Em seguida, 10 mL de cada cultura foi transferida para tubos de ensaio estéreis de 20 mL. Inicialmente todas as culturas foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e uma alíquota de 100 μ L (tempo zero) retirada de cada tubo na altura de 1 cm do topo da cultura e adicionada à 900 μ L do meio de cultura NB (diluição de 10 vezes). Os tubos permaneceram estáticos e nas primeiras 7 horas amostras foram coletadas de 1 em 1 hora, em seguida a cada 4 horas, e uma última leitura após 8 horas. As amostras foram coletadas e diluídas, a densidade óptica Abs 600 nm foi avaliada e multiplicada por 10, até o tempo 24 horas de experimento. O experimento foi realizado em cinco réplicas biológicas e 2 réplicas técnicas para cada isolado bacteriano. As médias das amostras foram utilizadas para obtenção dos desvios padrão.

3.14 Motilidade bacteriana

Para motilidade “swimming” foi utilizado o meio de cultivo NB (Li e Wang, 2011) com 0,3% de ágar e para motilidade “swarming” foi utilizado o meio NB com 0,7% de ágar (Malamud et al., 2011). A XccA, o mutante $\Delta XAC_RS22275$, o mutante $\Delta XAC_RS16355$ e o mutante duplo $\Delta XAC_RS22275-\Delta XAC_RS16355$ foram cultivados em meio de cultivo NA por 72 horas a 29°C em BOD, cinco colônias de cada isolado foram transferidas para um tubo tipo “Falcon” de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultivo NB e incubados a 29° por 16 horas, sob agitação constante de 180 rpm em equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker”. Em seguida a densidade óptica foi avaliada (as amostras com leitura até 0,8 foram utilizadas) e as amostras foram ajustadas para a densidade óptica Abs 600 nm, igual a 0,3, correspondente a 10^8 UFC/mL. Deste cultivo, 3 μ L de cada foi pingado no centro de placas de petri (tamanho 5,1 cm) contendo os meios semissólidos com 0,3% e 0,7% de ágar. As placas foram incubadas a 29°C, por 48 horas sem agitação em BOD. Para medir os discos formados pelas colônias da motilidade celular foi utilizado o programa “ImageJ” (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Foram feitas 5 réplicas biológicas e 5 réplicas técnicas para cada estirpe. As médias das amostras foram utilizadas para obtenção dos desvios padrão.

3.15 Análise estatística

Os resultados obtidos nos testes de agregação celular, motilidade, formação de biofilme, quantificação e extração de goma xantana foram analisados pelo programa “Sigma Plot”. O teste de “Tukey” foi utilizado para comparação das médias entre as amostras, a 5% ou 1% de probabilidade.

3.16 Estimativa do número de cópias de plasmídeo

As leituras dos dados de sequência brutos de XccA foram transferidas a partir dos números de acesso SRX195367 e SRX195344 do NCBI “Sequence Read Archive” (SRA) do projeto “BioProject PRJNA177640”. As leituras brutas foram mapeadas para o genoma do XccA (NC_003919, NC_003922 e NC_003921) utilizando o bowtie2 com parâmetros “--very-sensitive” e “--end-to-end” (Langmead e

Salzberg, 2012). A média de cobertura do cromossomo XccA e do plasmídeo pXAC64 foi estimada utilizando a ferramenta “samtools depth” (Li et al., 2009). O número de cópias de pXAC64 foi determinado dividindo a profundidade de cobertura dos plasmídeos pela do cromossomo.

4 RESULTADOS

4.1 Análise *in silico*: Diversidade e classificação das transglicosilases identificadas no genoma de XccA

Foram encontradas 14 LTs pertencentes às Famílias: 1A, 1B, 1C, 1D (2 cópias), 1F, 1G, 3A, 3B (3 cópias), 5A, 6A e uma proteína não classificada no genoma de XccA (Tabela 5, Apêndice C). Nenhuma LT pertencente as Famílias 1E, 1H, 2A e 4A foram identificadas. A ausência destas famílias de LTs não pode ser considerado um resultado surpreendente, pois dificilmente um micro-organismo apresentará em sua totalidade o arsenal conhecido de LTs (Dik et al., 2017). Além disso, LTs de diferentes famílias podem apresentar redundância funcional, justificando a ausência destas famílias (Scheurwater et al., 2008; Dik et al., 2017).

As LTs *XAC_RS22275* e *XAC_RS16355* foram identificadas e re-annotadas, sendo os nomes novos: *mltB2.1* (*XAC_RS22275* – presente no plasmídeo pXAC64) e *mltB2.2* (*XAC_RS16355* – presente no cromossomo de XccA), utilizados a partir de agora no trabalho. Os mutantes também serão renomeados: $\Delta XAC_RS22275/\Delta mltB2.1$, $\Delta XAC_RS16355/\Delta mltB2.2$ e $\Delta XAC_RS22275-\Delta 16355/\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$.

Os resultados indicam que as LTs *mltB2.1* (*XAC_RS22275*) e *mltB2.2* (*XAC_RS16355*) inseridas no transposon TnXax1 apresentam os domínios SLT_2 e PG_b1, ambos relacionados com a atividade remodeladora do peptidoglicano, pertencendo, de acordo com a literatura à família 3B (Apêndice C) (Dik et al., 2017). Também foi encontrada uma terceira LT que provavelmente pertence à família 3B (*XAC_RS21660*), apresentando quase o dobro de tamanho em resíduos de aminoácidos em relação a *mltB2.1* e *mltB2.2* (Tabela 5). Além disso, essa LT apresenta baixa identidade de sequência de aminoácidos com *mltB2.1* e *mltB2.2* (42% de identidade em 55% de cobertura), e também um domínio adicional ainda não descrito nesta subfamília (IPR011013), com provável função de epimerase (Apêndice C). Observamos que esta proteína é única em *Xanthomonadaceae*, enquanto que em outras famílias da classe gammaproteobacteria a encontramos divididas em duas proteínas: uma homóloga a *mltB2* e uma outra proteína com domínio relacionado a

função epimerase (Apêndice C). Além disso verificamos que esta LT não está associada a nenhum elemento genético móvel descrito em XccA, portanto, indicando origem e função distinta a *mltB2.1* e *mltB2.2*.

Como resultado adicional, foi identificada uma transglicosilase biossintética, *ORF XAC_RS15740*, classificada como MtgA, envolvida na biossíntese de peptidoglicano (Derouaux et al., 2008).

Tabela 5. Diversidade de LTs encontradas no genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e plasmídeo pXAC64. Classificação e nomes de genes propostos e papel em XccA (para um alinhamento detalhado e análise de domínio, consulte o Apêndice C).

Locus Tag (antigo)	Locus Tag (novo)	Nome	Coordenadas	Comprimento (aa)	InterproScan/PFAM/ Uniprot	LT classificação	Provável função
XAC3561	<i>XAC_RS18005</i>	<i>slt</i>	4,223,769.. 4,225,742	657	Lytic_TGlycosylase_superhx_U (IPR008939), SLT_1 (IPR008258; PF01464) and Q8PGQ5	1A	Reciclagem de parede celular e produção de monômeros de peptidoglicano
XAC2458	<i>XAC_RS12500</i>	<i>mltC</i>	2,862,053.. 2,863,036	327	SLT_1 (IPR008258; PF01464) and Q8PJS2	1B	Degradação de peptidoglicano
XAC2256	<i>XAC_RS11470</i>	<i>mltE</i>	2,639,080.. 2,639,691	203	SLT_1 (IPR008258; PF01464); Q8PKB9	1C	Inserção do sistema de secreção tipo 4
XAC2729	<i>XAC_RS13860</i>	<i>mltD2</i>	3,190,523.. 3,192,106	527	SLT_1 (IPR008258; PF01464);	1D	Desconhecida (relatada durante a interação planta-patógeno e patogênese bacteriana)
XAC1086	<i>XAC_RS05550</i>	<i>mltD1</i>	1,241,249.. 1,242,427	392	LysM (IPR018392; PF01476) and A0A0U5FH84; A0A0U5FC25		
XAC2617	<i>XAC_RS13315</i>	<i>sltF</i>	3,082,452.. 3,083,294	280	SLT_1 (IPR008258; PF01464); Q8PJB8	1F	Inserção de flagelos

XAC0038	<i>XAC_RS02185</i>	<i>hpaH</i> <i>/ etgA</i>	487,771.. 488,334	187	SLT_1 (IPR008258; PF01464) and A0A0U5GFN3	1G	Inserção do sistema de secreção tipo 3 e 4
XAC0662	<i>XAC_RS03435</i>	<i>mltB</i>	785,110.. 786,249	379	SLT_2 (IPR031304; PF13406) and Q8PPM4	3A	Reciclagem e resistência de parede celular
XAC3225	<i>XAC_RS16355</i>	<i>mltB2.2</i>	3,798,986.. 3,800,263	425	SLT_2 (IPR031304; PF13406);	3B	Desconhecida (relacionada à virulência bacteriana e <i>fitness</i>)
XACb0007	<i>XAC_RS22275</i>	<i>mltB2.1</i>	3,862.. 5,088 (pXAC64)		Pb_binding_1 (IPR002477; PF01471) and Q8 PHM6; Q8PRL3		
XAC1131	<i>XAC_RS05780</i>	<i>mltG</i>	1,281,557.. 1,282,630	357	YceG (IPR003770; PF02618) and Q8PNE1	5A	Regula o comprimento das cadeias de peptidoglicano
XAC0663	<i>XAC_RS03440</i>	<i>rlpA</i>	786,246.. 787,673	475	RlpA-like_sf (IPR036908); SPOR (IPR007730; PF05 036)	6A	Divisão celular ou morfogênese
XAC3047	<i>XAC_RS15470</i>	<i>mtgA</i>	3,564,980.. 3,565,720	246	Pep_trsgly (IPR011812), PBP_transglycosy lase (IPR036950), <i>Transgly</i> (PF00912), Q8PI51	Não classificada	Biossíntese do peptidoglicano

XAC4296	<i>XAC_RS21660</i>	n/a	5,077,186.. 5,079,348	828	SLT_2 (IPR031304; PF13406); PB_binding_1 (IPR002477; PF01471); Gal_mutarotase_s f_dom (IPR011013; PF13802) and A0A1T1SC85	3B (?)	Metabolismo de carboidratos/ quebra do peptidoglicano
----------------	--------------------	-----	--------------------------	-----	---	--------	---

*Considerando que todas as LTs classificadas têm uma função geral relacionada ao rearranjo da camada de peptidoglicano

4.2 Obtenção dos mutantes $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$

Para investigar o papel de duas LTs na virulência e patogenicidade de *XccA*, os genes *mltB2.1* e *mltB2.2* foram nocauteados em *XccA*, gerando os mutantes simples $\Delta mltB2.1$ ($\Delta XAC_RS22275$) (Ferreira, 2014) cedido para este trabalho, $\Delta mltB2.2$ ($\Delta XAC_RS16355$), além disso, ambos os genes foram deletados, gerando o mutante duplo $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ ($\Delta XAC_RS22275-\Delta XAC_RS16355$) (Figura 8). Todos os mutantes aqui estudados foram produzidos por PCR de extensão e sobreposição (Sn Ho, 1989), seguido pelo evento de recombinação homóloga (Lee et al., 2004). No caso do mutante $\Delta mltB2.2$, o gene *mltB2.2* foi deletado por completo, uma vez que os oligonucleotídeos foram desenhados na região intergênica da sequência. O mutante $\Delta mltB2.1$ foi obtido a partir da deleção de 912 pb do gene *mltB2.1*, restando uma sequência de 369 pb apenas (Figura 8). O mutante duplo foi obtido a partir da deleção de ambos os genes *mltB2.1* e *mltB2.2*. As mutações foram confirmadas por PCR de colônia, em gel de agarose 1% (Figura 8) e por sequenciamento utilizando oligonucleotídeos específicos para diferenciar os genes (Tabela 4A).

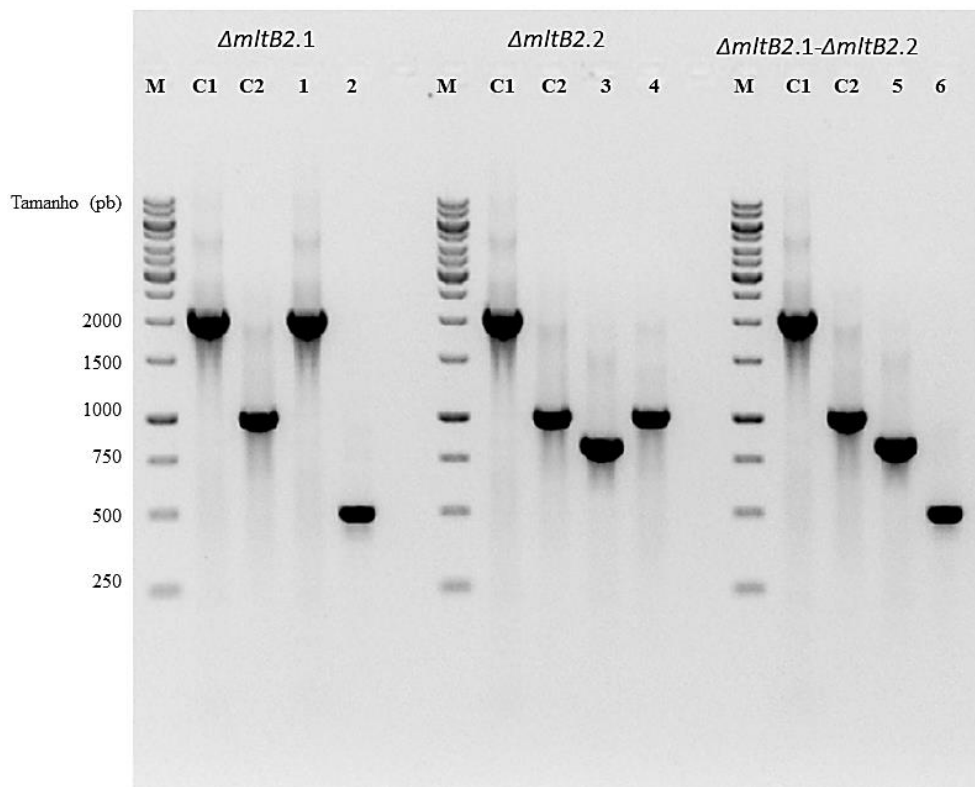
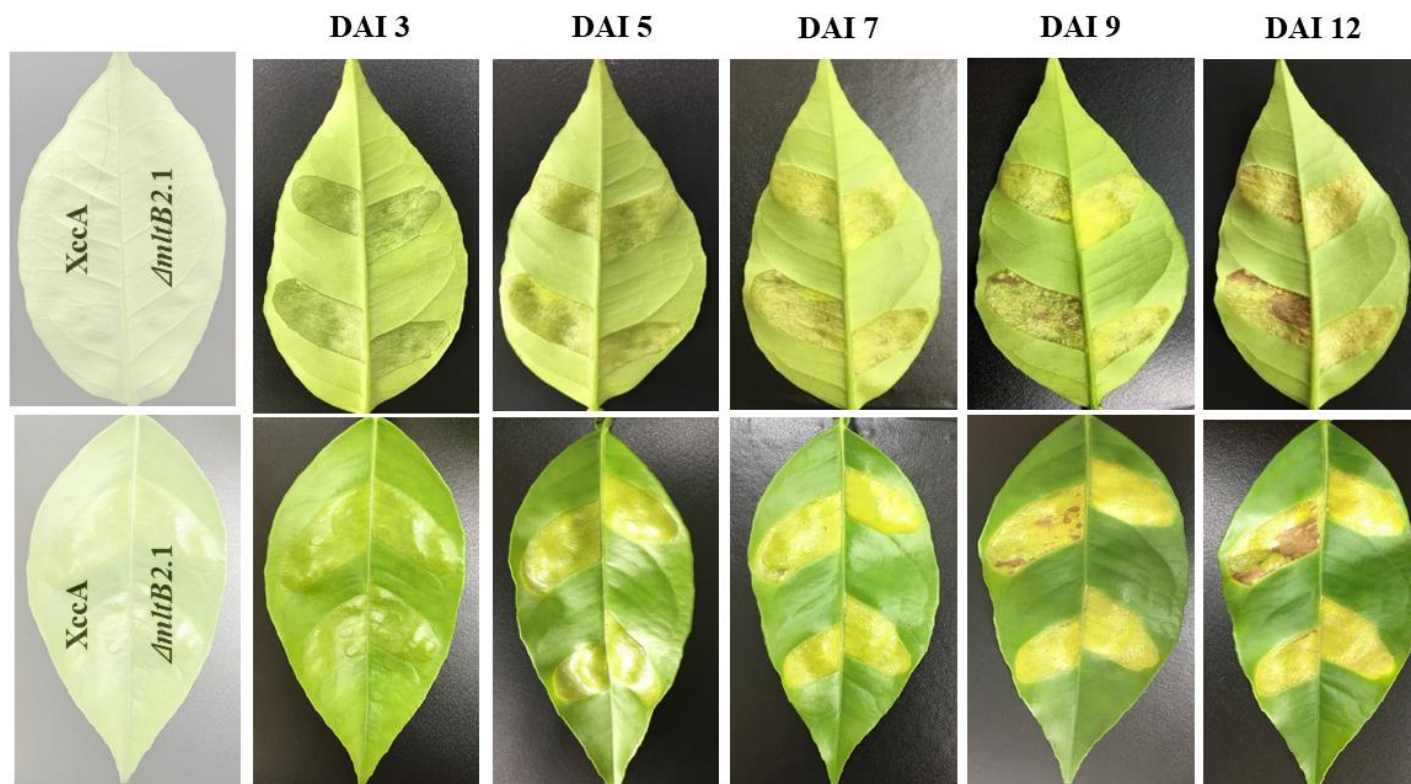


Figura 8. Géis de eletroforese em agarose (1%) corado com brometo de etídio (10 mg/mL), visualizados em Fotodocumentador CHEMIDOC MP BIO-RAD. M:

marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas). Mutante $\Delta mltB2.1$: (C1) gene *mltB2.2* 2100 pb; (C2) gene *mltB2.1*, 1200 pb; (1) gene *mltB2.2*, 1278 pb; (2) gene *mltB2.1* nocauteado ($\Delta mltB2.1$), com 369 pb; Mutante $\Delta mltB2.2$: (C1) gene *mltB2.1*, 2100 pb; (C2) gene *mltB2.1*, 1200 pb; (3) gene *mltB2.2* nocauteado ($\Delta mltB2.2$), 1000 pb; (4) gene *mltB2.1*, 1200 pb; Mutante duplo $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$: (C1) gene *mltB2.1*, 2100 pb; (C2) gene *mltB2.1*, 2 pb; (5) gene *mltB2.2* nocauteado ($\Delta mltB2.1$, 1000pb); (6) gene *mltB2.1* nocauteado ($\Delta mltB2.1$), 369 pb.

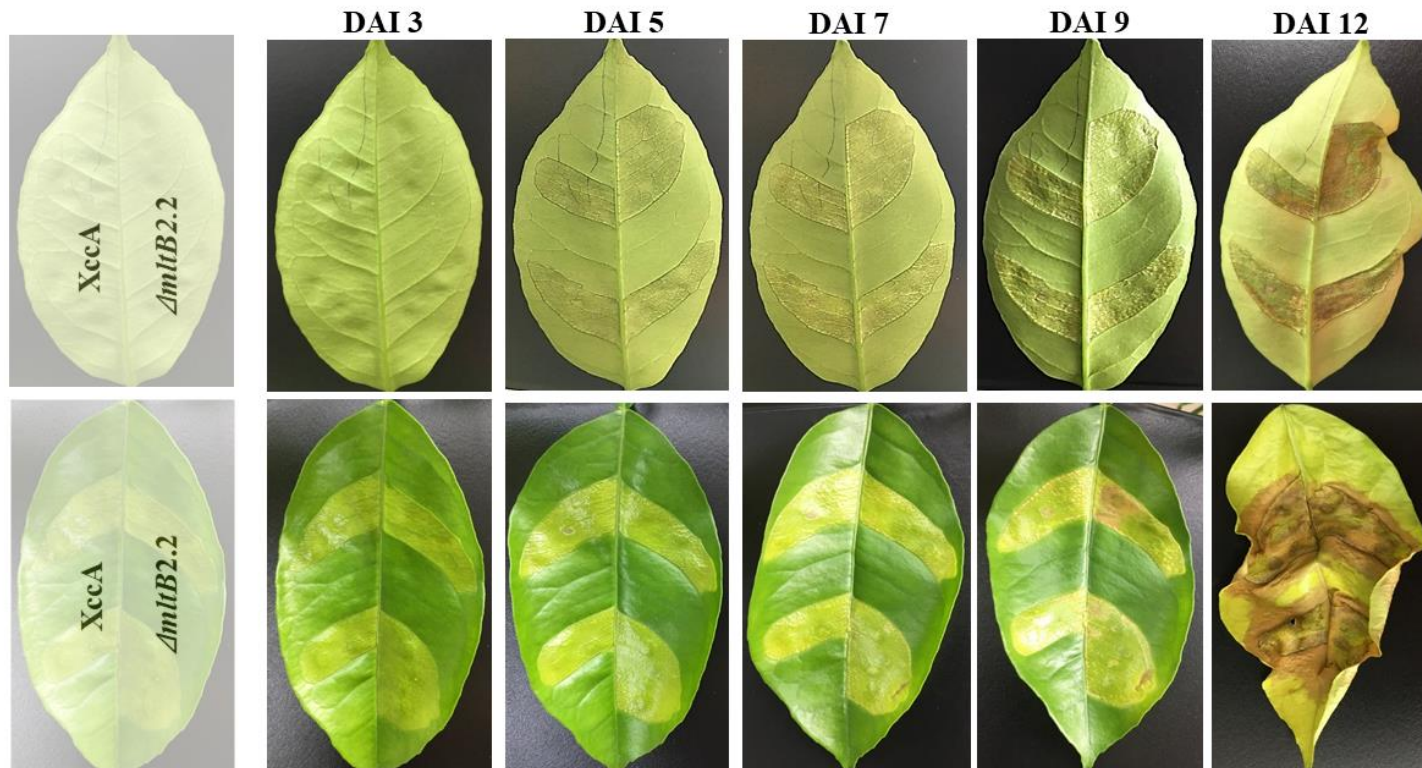
4.3 Análise fenotípica das LTs *mltB2.1* e *mltB2.2*

Para avaliar o fenótipo dos mutantes, folhas jovens na variedade moderadamente resistente Laranja ‘Pêra Rio’ (*Citrus sinensis* L. Osbeck) foram inoculadas por infiltração, perfuração e aspensão, sendo os sintomas avaliados por fotografias (Figuras 9, 10, 11 e 12).



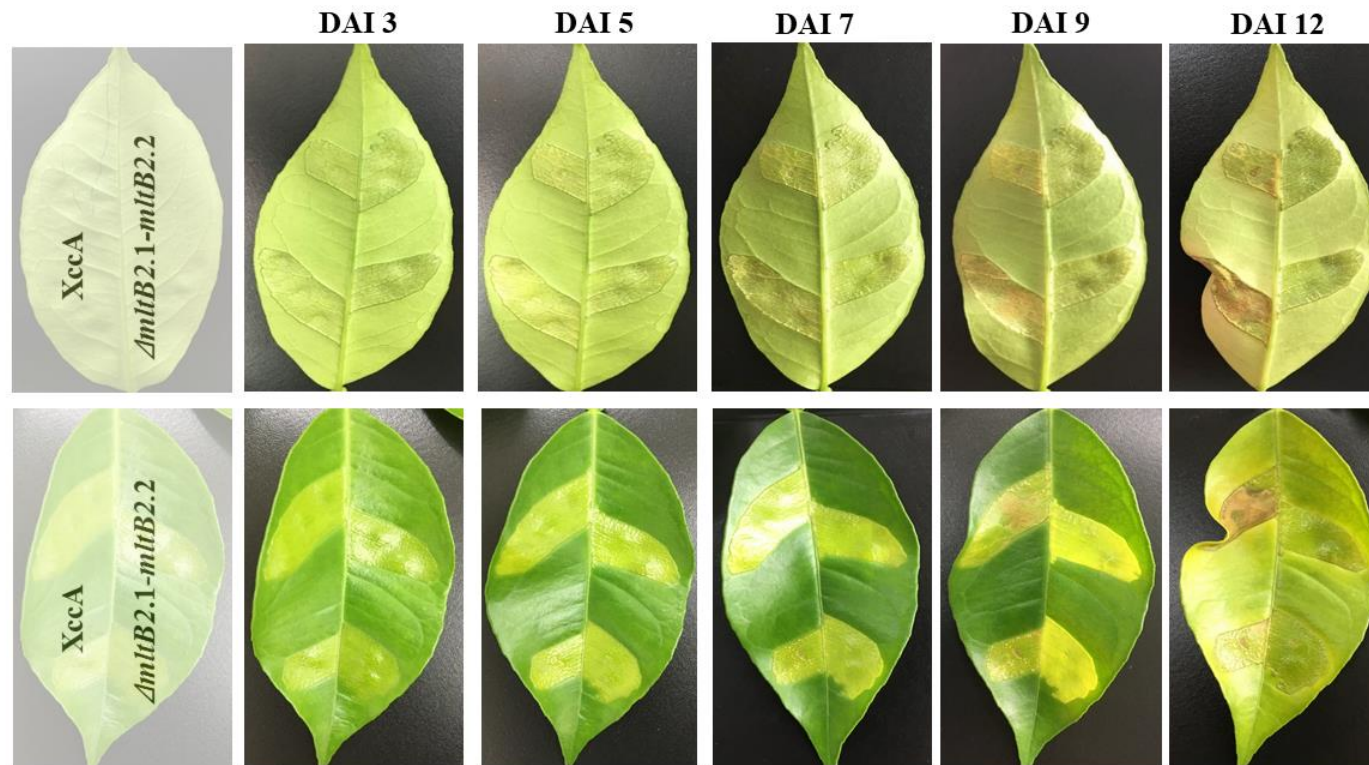
Encharcamento	X	X	X	X	X	X				
Hiperplasia			X	X	X	X	X	X	X	X
Necrose							X		X	

Figura 9. Teste de patogenicidade por infiltração. Sintomas observados no 1°, 3°, 7°, 9°, 12° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e mutante $\Delta ml t B 2.1$ na superfície adaxial (folhas superiores no quadro) e abaxial (folhas inferiores no quadro) de folhas jovens de Laranja “Pêra Rio”. As duas linhagens bacterianas foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC/mL.



Encharcamento			X	X	X	X				
Hiperplasia			X	X	X	X	X	X	X	X
Necrose									X	X

Figura 10. Teste de patogenicidade por infiltração. Sintomas observados no 1°, 3°, 7°, 9°, 12° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e o mutante $\Delta mtB2.2$ na superfície adaxial (folhas superiores no quadro) e abaxial (folhas inferiores no quadro) de folhas jovens de Laranja “Pêra Rio”. As duas linhagens bacterianas foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC/mL.



Encharcamento	X	X	X	X	X	X	X	X		
Hiperplasia			X	X	X	X	X	X	X	X
Necrose							X		X	

Figura 11. Teste de patogenicidade por infiltração. Sintomas observados no 1°, 3°, 7°, 9°, 12° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e o mutante $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ na superfície adaxial (folhas superiores no quadro) e abaxial (folhas inferiores no quadro) de folhas jovens de Laranja “Pêra Rio”. As duas linhagens bacterianas foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC/mL.

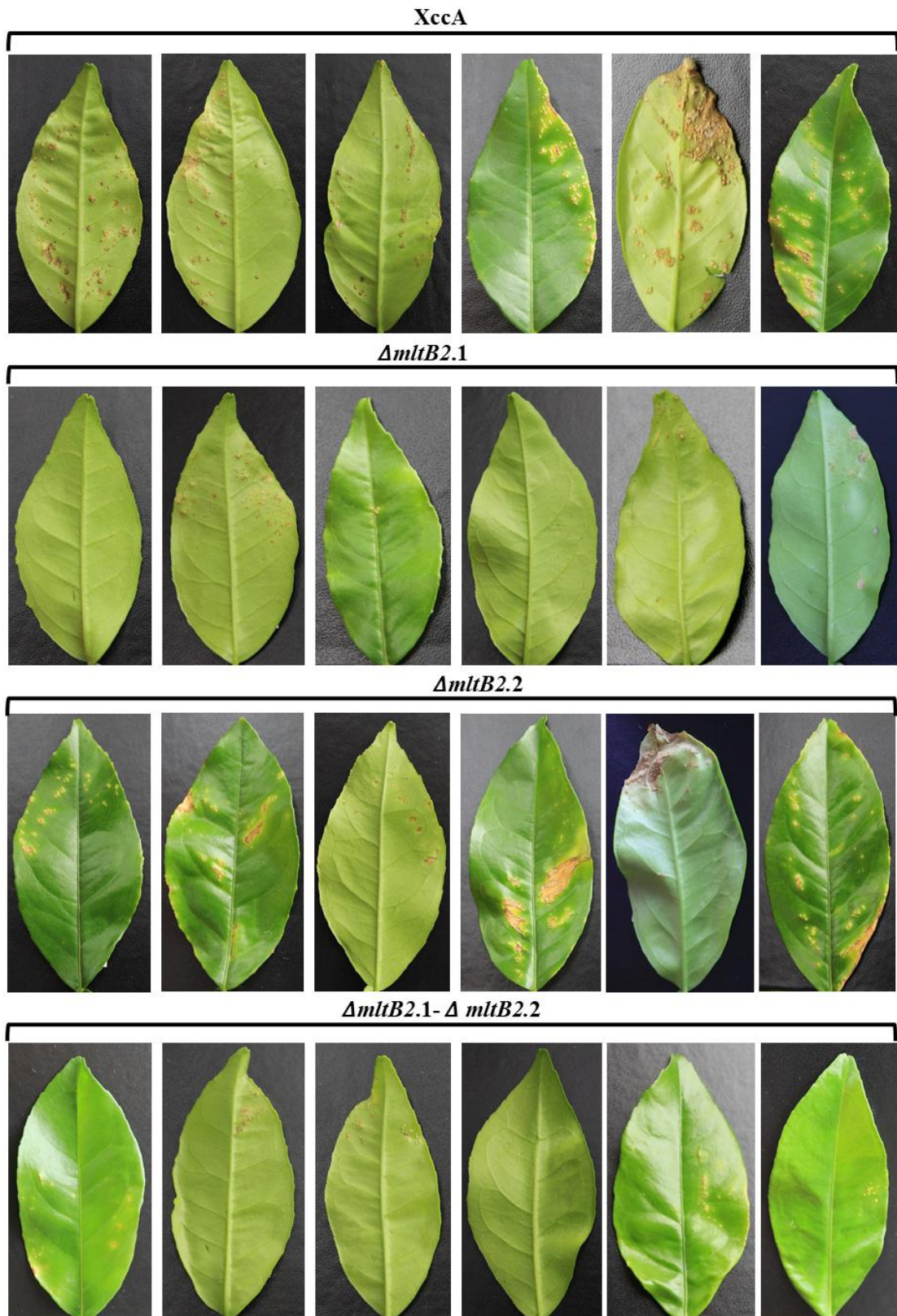


Figura 12. Ensaio de aspersão. Sintomas observados no 21° DAI (Dia Após a Inoculação) das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ na superfície adaxial e abaxial de folhas jovens de Laranja “Pêra Rio”. As linhagens bacterianas foram aspergidas na concentração de 10^8 UFC/mL.

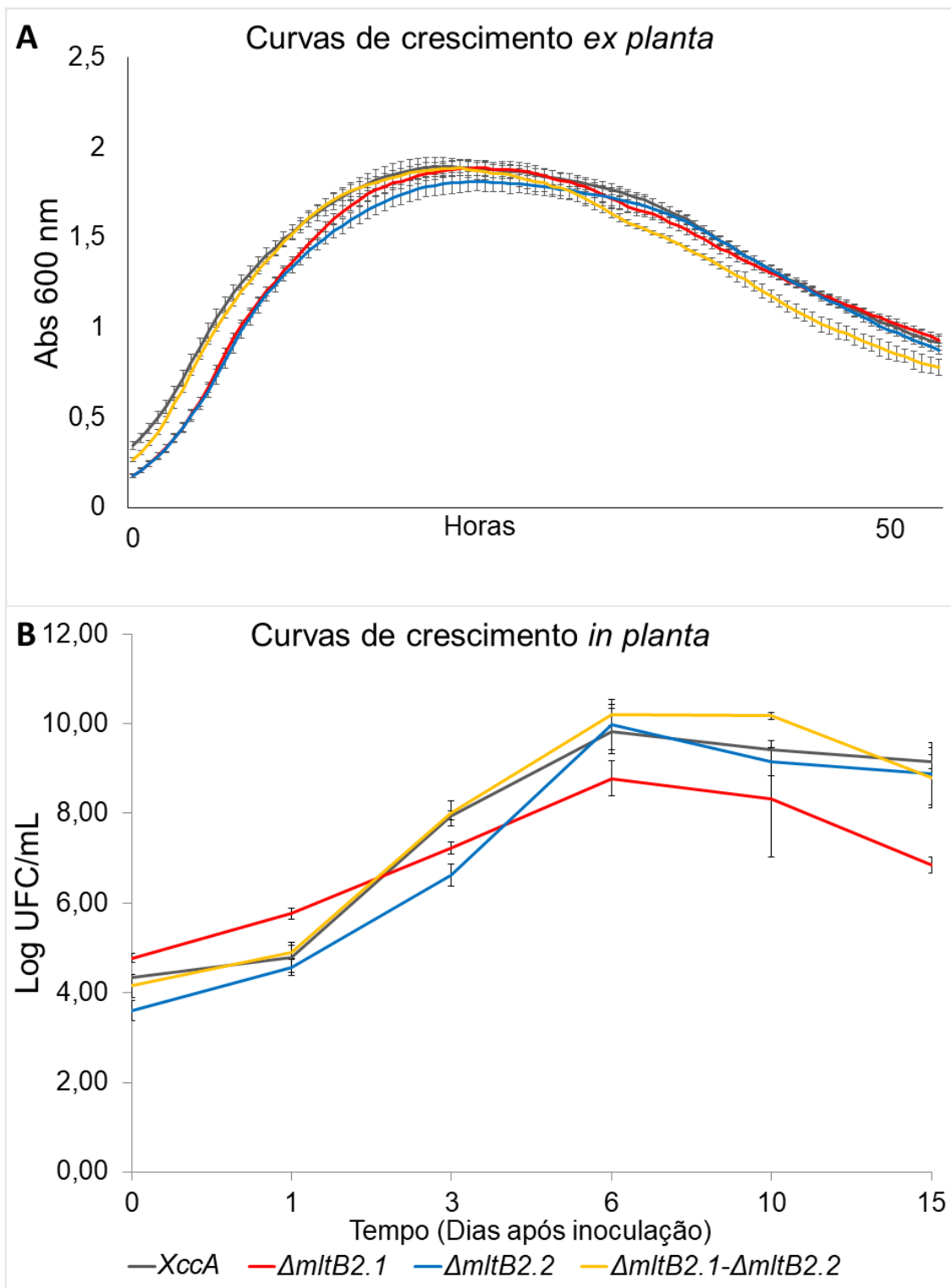


Figura 13. Curvas de crescimento *ex planta* e *in planta*. (A) Curva de crescimento *ex planta* realizada por 48 horas entre as linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ em meio de cultura rico NB. (B) Curva de crescimento *in planta* realizado em concentração de 10^6 UFC/mL para as linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ em folhas de Laranja “Pêra Rio”. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão.

A análise das curvas de crescimento *ex planta* de XccA e dos mutantes ($\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$) mostram que as mutações nos genes *mltB2.1* e *mltB2.2* apresentaram fase Lag, Log e estacionária semelhantes a XccA, portanto, não houve alteração em meio de cultura NB (Figura 13A).

O crescimento bacteriano *in planta* foi avaliado na variedade moderadamente resistente Laranja “Pêra Rio” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) na concentração de 10^6 UFC/mL durante 15 dias (Figura 13B). Foi observado que na ausência do gene *mltB2.1* há diminuição na população bacteriana, enquanto que na ausência de *mltB2.2* não, sugerindo maior importância da cópia plasmidial para a bactéria. Já na ausência de ambos os genes *mltB2.1* e *mltB2.2* o crescimento bacteriano supera a estirpe selvagem XccA. Este resultado pode estar relacionado a aquisição dos genes por transferência lateral mediante a ação do transposon TnXax1. Sugerimos que a XccA não apresentou estes genes o tempo todo, e no momento de sua aquisição houve melhora no processo de infecção e progressão da doença. Dessa forma, ao nocauteamos ambos os genes, da bactéria “retorna” a uma outra condição, onde tem que ativar outros mecanismos e fatores de virulência que favoreçam sua sobrevivência e colonização do hospedeiro.

O teste de infiltração foi realizado em folhas da variedade moderadamente resistente Laranja “Pêra Rio” utilizando-se suspensão bacteriana com 10^8 UFC/mL e o desenvolvimento do fenótipo foi observado durante 12 dias (Figuras 9, 10 e 11). Enquanto a XccA apresenta encharcamento, hiperplasia e necrose a partir do DAI 7, os mutantes $\Delta mltB2.1$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ apresentam apenas encharcamento e hiperplasia, evidenciando o atraso no desenvolvimento dos sintomas em relação a cepa XccA (Figura 9 e 11, respectivamente). Já o mutante $\Delta mltB2.2$ não mostrou diferença quanto ao desenvolvimento dos sintomas de CC, apresentando os sintomas de encharcamento, hiperplasia e necrose de forma semelhante a XccA (Figura 10).

A inoculação por aspersão foi realizada em plantas da variedade Laranja “Pêra Rio” utilizando-se suspensão bacteriana com 10^8 UFC/mL e acompanhado até o 21º dia (Figura 13). O mutante $\Delta mltB2.2$ apresentou desenvolvimento semelhante à XccA. Enquanto os mutantes $\Delta mltB2.1$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ levam a redução nas lesões do CC e também atraso no aparecimento dos sintomas quando comparadas a estirpe XccA. Estes resultados sugerem que as estirpes $\Delta mltB2.1$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ não

são capazes de causar doença no hospedeiro com a mesma agilidade do mutante $\Delta mltB2.2$, que se mostrou semelhante a XccA.

Dessa forma, juntos, estes resultados mostram que *mltB2.1* e *mltB2.2* não são essenciais para a sobrevivência de XccA bem como para o desenvolvimento do CC, sendo que ocorre apenas um atraso dos sintomas, ainda que significativo. A deleção do gene do plasmídeo, *mltB2.1* resulta em atraso na intensidade e aparecimento do CC, o que não ocorre no mutante para o gene *mltB2.2*, sugerindo que uma cópia apresenta maior papel em relação a outra, e que este gene pode estar relacionado ao aumento da patogenicidade de XccA.

4.4 Análise da formação de biofilme, produção de goma xantana e agregação celular

Houve diferença significativa na produção de biofilme entre a estirpe XccA e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$, para ambos os meios, meio rico NB e meio mínimo indutor de virulência XVM2 (Figuras 14A e 14B). Quanto aos mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$, não houve diferença estatística para a produção de biofilme quando comparados entre si. O Teste de “Tukey” foi empregado ao nível de 1% de probabilidade ($P = <0,001$) para ambos os testes (Figura 14).

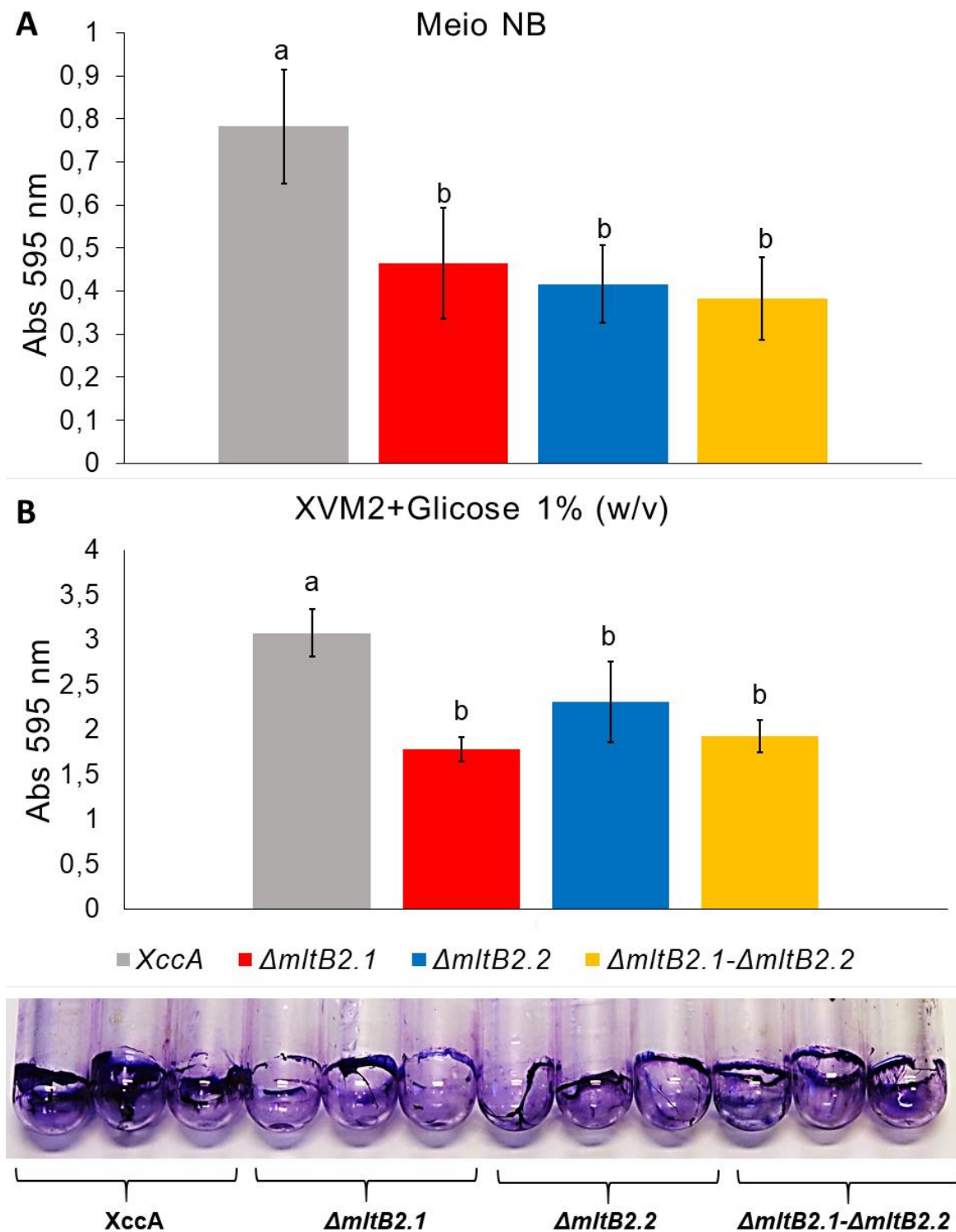


Figura 14. Ensaio de formação de biofilme. O teste de formação de biofilme foi realizado das linhagens *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ em meio rico NB (A) e em meio mínimo XVM2 (B), em tubos de vidro tipo borossilicato. O experimento foi realizado com quatro réplicas biológicas e cinco réplicas técnicas para cada amostra. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão.

O ensaio de agregação celular realizado com os isolados bacterianos revelou uma associação mais rápida entre as células de *XccA* quando comparada com os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ (Figura 15). O gráfico demonstrou uma queda no intervalo de 0 a 1 hora para *XccA*, enquanto para os mutantes houve apenas decréscimo bem lento e constante das barras a partir de 1 hora em diante, sugerindo que a maioria de suas células permanecem dispersas. Para os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ é possível observar que a partir de 11 horas houve queda abrupta dos dados de absorvância da parte superior das soluções (Figura 15).

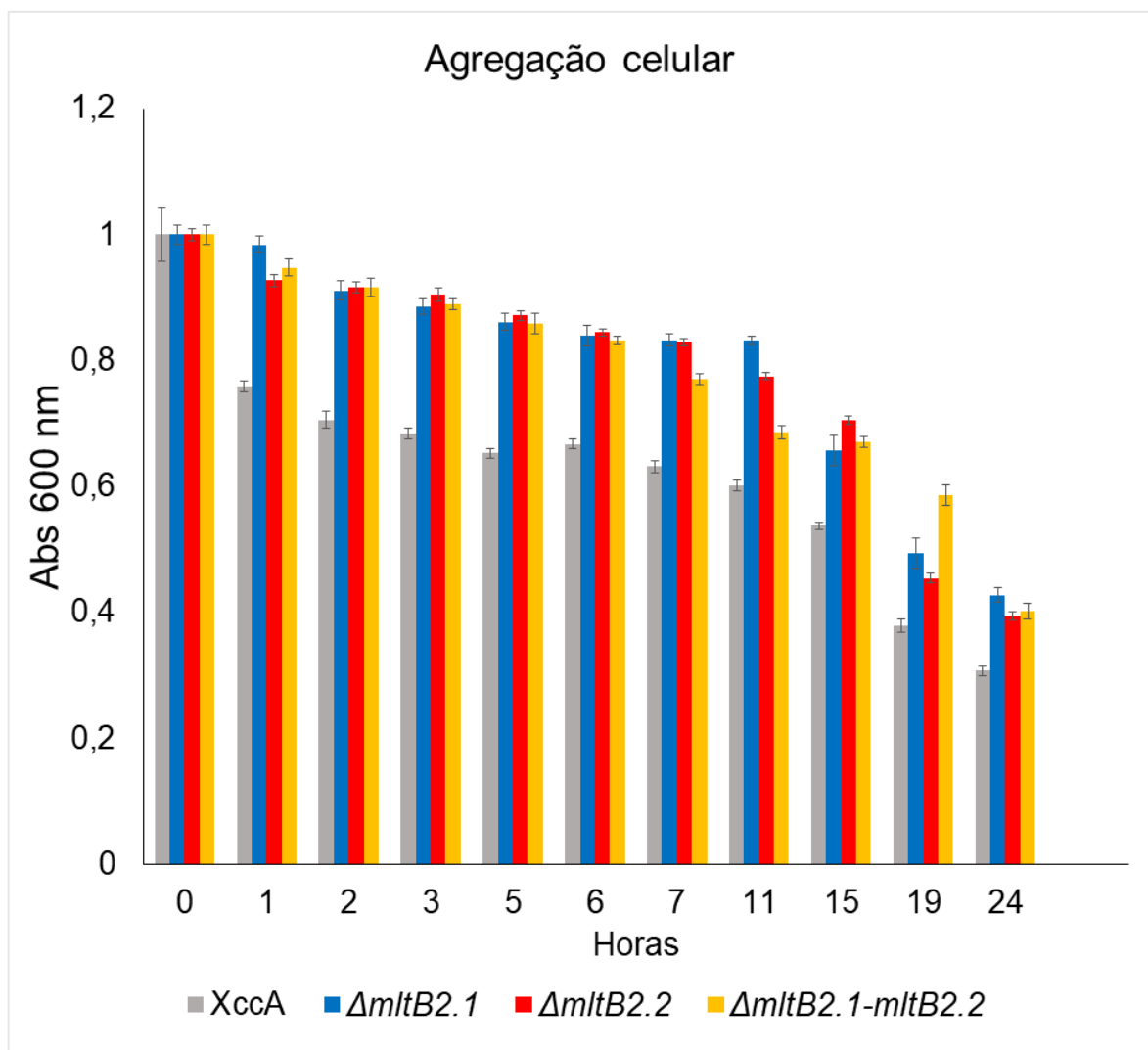


Figura 15. Ensaio de agregação celular. O ensaio de agregação celular foi realizado para a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ no período de 24 horas. O teste foi realizado em 5 réplicas biológicas e 2 réplicas técnicas para cada amostra. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão.

A produção de goma pela XccA e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ está na Figura 16. A análise feita utilizando o programa “Sigma Plot”, demonstra maior produção de goma para o mutante $\Delta mltB2.1$, seguido pelo mutante $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ em comparação a XccA. Quando a produção de goma foi comparada apenas entre os mutantes, não houve diferença significativa (Figura 16). O Teste de “Tukey” foi realizado ao nível de 1% de probabilidade ($P = <0,001$).

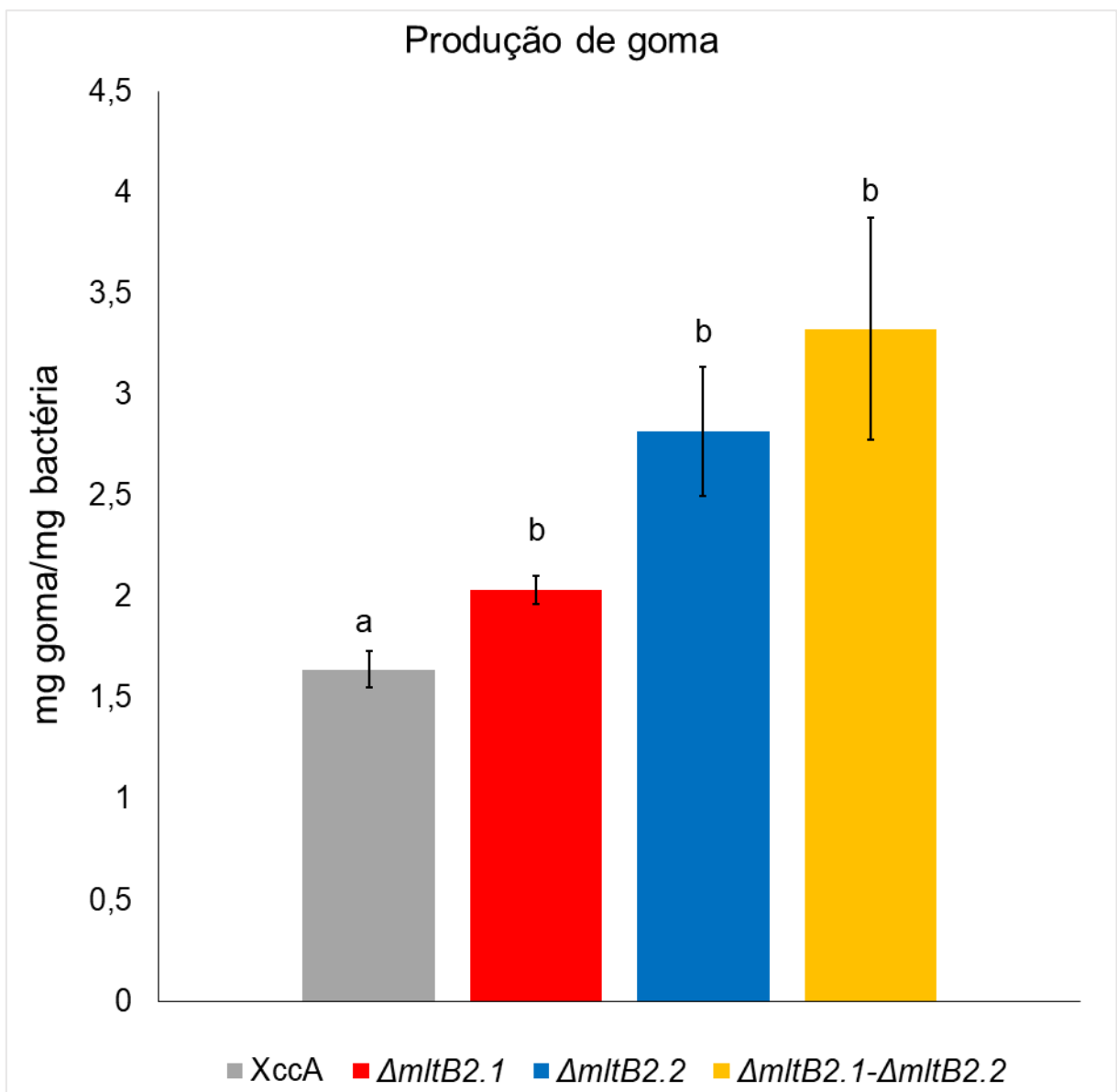


Figura 16. Produção de goma xantana. Relação da produção de goma/biomassa para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$. O teste foi realizado em 3 réplicas biológicas. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão.

4.5 Análise das motilidades “swimming” e “swarming”

Ambos os testes de motilidade “swarming” e “swimming” não mostraram diferenças significativas entre a estirpe XccA e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$. O Teste de “Tukey” foi empregado ao nível de 1% de probabilidade ($P = <0,001$) (Figura 17). Este resultado sugere que *mltB2.1* e *mltB2.2* não estão envolvidos com o mecanismo de formação de flagelos e motilidade bacteriana.

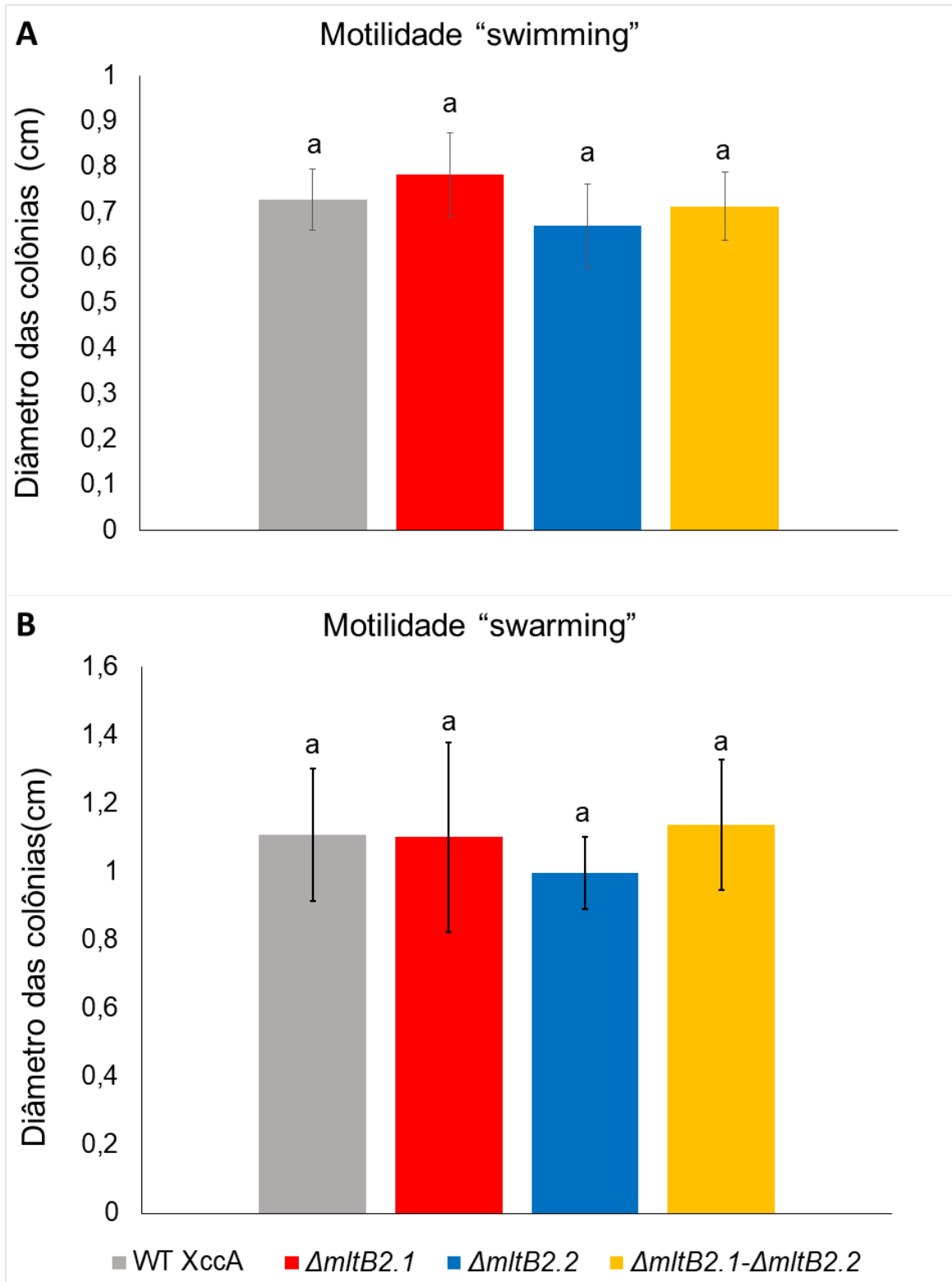


Figura 17. Motilidade bacteriana. (A) Motilidade "swimming" realizada em meio semi-sólido (0,3% de ágar) para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$. (B) Motilidade "swarming" realizada em meio semi-sólido (0,7% ágar) para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A e os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$. O teste foi realizado em 5 réplicas biológicas e 5 réplicas técnicas para cada isolado. Os valores apresentados representam a média e o respectivo desvio padrão

4.6 Identificação do número de cópias do plasmídeo pXAC64

Para determinar se as diferenças observadas entre os mutantes *ΔmltB2.1* e *ΔmltB2.2* podem ser explicadas pelo número de cópias do plasmídeo e do cromossomo, ambas foram estimadas diretamente a partir dos dados depositados no “NCBI Sequence Read Archive” (SRA).

De acordo com a análise do índice de cobertura, foram calculadas 3 cópias de pXAC64 por origem de replicação cromossômica. Esse número é semelhante ao número de cópias estimado de pXOCgx01 e pXap41 de *X. oryzae* pv. *oryzicola* e *X. arboricola* pv. *pruni*, de 4 cópias por célula (Pothier et al., 2011; Niu et al., 2015). Como o pXAC64, esses plasmídeos carregam genes relacionados a conjugação, o transposon TnXax1 e vários genes de virulência e patogenicidade, como: genes de tolerância a metais pesados e efetores do SST3 (Pothier et al., 2011; Niu et al., 2015).

5 DISCUSSÃO

5.1 Diversidade de LTs encontradas no genoma de XccA

LTs da Família 1

A ORF *XAC_RS18005* foi classificada como uma LT subfamília 1A, sendo homóloga as proteínas Slt70, Slt e LtgA (Tabela 5, Apêndice C). As proteínas da família 1A tem sido estudada em *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, e ambos mostraram função relacionada a divisão celular. O nocaute das LTs da família 1A, LtgA (*N. gonorrhoeae*) e Slt70 (*E. coli*), não reduziram a viabilidade celular, portanto foi sugerido que ambas não estão associadas com a divisão celular (Dik et al., 2017), sendo que estas proteínas podem atuar na reciclagem de peptidoglicanos, limitando a exposição a proteínas antimicrobianas (Ragland et al., 2017). Diante disso, supõe-se que a ORF *XAC_RS18005* apresente função similar a outras proteínas da família 1A, contribuindo para a integridade de XccA frente ao hospedeiro e/ou meio ambiente.

A ORF *XAC_RS12500* é homóloga a proteína MltC e LtgB da subfamília 1B (Tabela 2; Apêndice C), apresentando provável função relacionada com montagem e maturação da parede celular (Arends et al., 2010). Já a proteína *XAC_RS11470* foi classificada como pertencente à família 1C (Tabela 5; Apêndice C), apresentando similaridade com a LT MltE de *E. coli*. A proteína MltE é recrutada pelo domínio periplasmático TssM, um componente estrutural do sistema de secreção tipo 6 (SST6), para degradação do peptidoglicano presente na parede celular no local em que o complexo será inserido (Santin e Cascales, 2017). Além disso, MltE forma um complexo com a Bulgecina A (Santin e Cascales, 2017), um composto que apresenta capacidade de inibir a atividade de algumas LTs (Williams et al., 2017). A Bulgecina A age de forma competitiva com o glutamato catalítico presente nestas proteínas, e aumenta a eficácia com os antibióticos β -lactâmicos, restaurando sua eficácia (Williams et al., 2017). As LTs são especuladas como um novo alvo para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas, pois apresentam capacidade de aumentar a ação de antibióticos β -lactâmicos. Curioso que alguns organismos Gram-

negativos, incluindo *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* e *N. gonorrhoeae*, revisados por Dik et al. (2017), não codificam um homólogo de MltE, enquanto que XccA apresenta um homólogo. Este resultado é interessante, pois pode trazer novas alternativas para o estudo de compostos que inibem o crescimento do patógeno, bem como um novo organismo a ser utilizado no desenvolvimento de antibióticos e/ou compostos sinérgicos.

As ORFs *XAC_RS13860* e *XAC_RS05550* são homólogas a MltD, MltD1, mltD2 e LtgE da subfamília 1D das LT (Tabela 5; Apêndice C). Estas LTs apresentam o domínio LysM, conhecido por proporcionar a ligação ao peptidoglicano em proteínas que são associadas a patogênese de algumas bactérias e ao rearranjo e degradação de mureína (Mulder et al., 2006). Algumas proteínas desta família já foram associadas ao metabolismo e rearranjo do peptidoglicano, redução da autólise celular e também durante a interação planta-patógeno e patogênese bacteriana, no entanto, a função celular desta família permanece desconhecida (Dik et al., 2017).

A proteína *XAC_RS13315* é homóloga a SlfF de *Rhodobacter sphaeroides* (Tabela 5; Apêndice C). Sabe-se que SlfF interage com FliJ e atua na remodelagem da parede celular para que ocorra a inserção de proteínas flagelares no peptidoglicano, e que uma mutação na região N-terminal da proteína SlfF anula a motilidade bacteriana (De La Mora et al., 2007). Este resultado sugere que a Família 1F está associada a montagem de flagelos, no entanto, ela pode não ser essencial, pois até o momento não foram encontradas homólogas a essa proteína em outros organismos que possuem flagelos, como *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae* e *S. maltophilia* (Dik et al., 2017).

A ORF *XAC_RS02185* é homóloga às proteínas da Família 1G, LtgX e EtgA (Tabela 5; Apêndice C). As LTs pertencentes a família 1G são reconhecidas como proteínas capazes de remodelar a parede celular para inserção de sistemas de secreção 3 e 4, contribuindo para a translocação de DNA exógeno e de fatores de virulência em seu hospedeiro (Dik et al., 2017). Algumas LTs da família 1G já foram estudadas em *Xanthomonadales*, trazendo mais informações sobre sua função e relação com a patogenicidade e virulência. Em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, agente causal da queima bacteriana do arroz, a deleção do gene *hpa2* (*PXO_RS00425*, 86% identidade com *XAC_RS02185*) reduziu a severidade dos sintomas da doença e a população bacteriana na superfície foliar (Zhang et al., 2008).

Em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, foi proposto que o gene *hpa2* (*XOC_RS19750*, 84% de identidade com *XAC_RS02185*) interage com genes do SST3 formando um complexo para translocar efetores do patógeno para o hospedeiro (Li et al., 2011b). Posteriormente foi mostrado que o gene homólogo *hpaH* do patógeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*IS_RS03455*, 94% de identidade com *XAC_RS02185*) está localizado no periplasma bacteriano, onde se liga ao peptidoglicano e contribui para a translocação de efetores para o interior de células do hospedeiro (Hausner et al., 2017).

Não foram encontradas proteínas das subfamílias 1E, 1H em XccA. A Família 1E é regulada por um mecanismo alostérico (não demonstrado) (Dik et al., 2017). Sua função está relacionada à degradação pontual do peptidoglicano da parede celular, permitindo a passagem do pilus, fímbrias e outros complexos macromoleculares (Dominguez-Gil et al., 2016). A Família 1H possui o domínio de ligação ao peptidoglicano, PG_binding_1, semelhante à Família 3B (Dik et al., 2017). A única proteína da Família 1H é GP144, originada de bacteriófagos (Dominguez-Gil et al., 2016). Sabe-se que GP144 interage com as proteínas de membrana e sua deleção causa ruptura das membranas e eventual lise celular (CLOUTIER *et al.* 2010), portanto, pode ter função essencial na célula. No entanto, ainda não há função e mecanismo completamente elucidados.

A função de inserção de pilus e complexos macromoleculares descritos na Família 1E também já foi associada às Famílias 1C, 1F, 1G e 3B, portanto, podem apresentar mesma função. A família 1H apresenta os mesmos domínios da superfamília 1 e da Família 3, dessa forma, apesar de não apresentar função e mecanismos elucidados podem apresentar função semelhante. Dessa forma, a ausência das famílias 1E e 1H podem estar relacionadas à redundância funcional dessas proteínas (Heidrich et al., 2002; Scheurwater et al., 2008; Dik et al., 2017; Hausner et al., 2017) , que pode ser realizada por outras LTs presentes no genoma de XccA.

LTs da Família 3

As LTs pertencentes a família 3 apresentam mecanismo de funcionamento pouco conhecido (Lee et al., 2013; Dik et al., 2017). A família 3 está dividida em 2

subfamília baseada na presença ou ausência do domínio PG_binding_1 (Dik et al., 2017). Em XccA há apenas uma proteína da subfamília 3A, a ORF *XAC_RS03435*, que possui apenas o domínio SLT_2 e um glutamato (Glu) catalítico na posição 162 (Tabela 5; Apêndice C). As enzimas dessa subfamília têm alta afinidade pelo peptidoglicano, apresentam atividade exolítica, onde raramente são formados produtos (Lee et al., 2013). Em *Neisseria gonorrhoeae* proteínas da subfamília 3A, LtgA e LtgD, foram relacionadas a virulência, atuando para reforçar o envoltório celular da bactéria, melhorando sua resistência contra ação de agentes externos (Ragland et al., 2017).

A subfamília 3B apresenta em sua porção C-terminal o domínio PG_binding_1, cuja função está associada a ligação das transglicosilases ao peptidoglicano e aumento na atividade enzimática das LTs (Heffron et al., 2009). Apesar das funções destes domínios serem bem definidas, faltam estudos que demonstrem o mecanismo destas LTs (Dik et al., 2017). Em XccA foram encontradas 2 proteínas dessa subfamília, sendo elas *XAC_RS22275*, *XAC_RS16355*. As ORFs *XAC_RS22275* e *XAC_RS16355*, denominadas *mltB2.1* e *mltB2.2*, respectivamente, apresentando 425 resíduos de aminoácidos e uma região de peptídeo sinal de 27 aa (predição feita por SignalP 4.1 [<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>]). Análises *in silico* dessas proteínas demonstram que MltB2.1 e MltB2.2 tem 99% de similaridade, diferindo em apenas 5 bases e um aminoácido em sua sequência (Ser por Ala na posição 51). Além disso, são genes passageiros do transposon *TnXax1*, relacionados a disseminação de patogenicidade e virulência por toda a ordem *Xanthomonadales* (Ferreira et al., 2015; Gochez et al., 2018).

LTs da família 5A

Foi identificada uma proteína da família 5 e uma da família 6 em XccA (Tabela 5; Apêndice C). A ORF *XAC_RS05780* pertence à Família 5A é comumente conhecida como MltG (Dik et al., 2017). Em *E. coli* MltG, está localizada na membrana interna, e é relacionada ao alongamento das cadeias de peptidoglicanos (Yunck et al., 2016). Tal fato foi observado em cepas mutantes para a LT MltG de *E. coli*, que apresentaram aumento das cadeias de peptidoglicanos comparados à linhagem selvagem (Yunck et al., 2016). A proteína MltG parece ser conservada entre diversas espécies de micro-

organismos procariotos, por exemplo em *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *N. gonorrhoeae* e *XccA* e *Streptococcus pneumoniae*, sugerindo que sejam importantes para a célula (Dik et al., 2017). No entanto, seus mecanismos de ação ainda não foram totalmente elucidados.

LTs da família 6A

A ORF *XAC_RS03440* é similar a transglicosilase RlpA de *Stenotrophomonas maltophilia* da família 6A (Tabela 5; Apêndice C). Ambas possuem um domínio C-terminal DBPP_1, ainda não caracterizado e um domínio C-terminal SPOR, relacionado a formação do anel septal durante a divisão celular ou morfogênese (Arends et al., 2010). Em *P. aeruginosa* cepas cuja proteína RlpA foi nocauteada apresentaram cadeias de células mais longas em comparação à linhagem selvagem, no entanto, cada uma apresentava um septo visível, mas divisão celular incompleta (Jorgenson et al., 2014). Em *E. coli*, a ausência de RlpA não se apresentou essencial para a divisão celular (Arends et al., 2010), diferente do observado em *P. aeruginosa* (Jorgenson et al., 2014). Em adição, foi observada uma baixa identidade de sequência dos domínios SPOR entre as espécies, sugerindo que podem ter diferentes funcionalidades (Dik et al., 2017). Mais experimentos serão necessários para entender o papel da família 6A LTs em seus respectivos organismos.

LTs não classificadas

A LT *XAC_RS21660* foi identificada neste trabalho e apresenta-se exclusiva na família *Xanthomonadaceae*. Em adição, foi observado que em outras espécies, como *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* ao fazer um Blast da ORF *XAC_RS21660* aparecem duas proteínas, MltB2 e Galactose mutarotase, indicando que em algum momento durante a evolução houve a fusão destes genes, pelo menos em *Xanthomonas*.

Um alinhamento utilizando a ferramenta Blast mostrou que a ORF *XAC_RS21660* possui 43% de identidade e 50% de cobertura com *XAC_RS16355*, e 42% de identidade e 50% de cobertura com *XAC_RS22275*. A ORF *XAC_RS21660* possui 828 resíduos de aminoácidos, apresenta os domínios SLT_2, PG_binding_1 e

um domínio adicional Galactose-mutarotase relacionado com função epimerase (Tabela 5, Apêndice C), dessa forma, sugerimos a classificação da *XAC_RS21660* na família 3B. As epimerases bacterianas estão envolvidas na produção de polímeros de carboidratos complexos que são utilizados nas paredes e envelopes celulares e são reconhecidos como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de infecção bacteriana (Allard et al., 2001). Dessa forma, as divergências de similaridade entre as sequências de aminoácidos indicam que se tratam de proteínas com estrutura, função e origens distintas, sugerindo que *XAC_RS21660* provavelmente desempenha uma função distinta.

Ausência das famílias 2A e 4A

Não foram encontradas LTs das famílias 2A e 4A em *XccA*. Semelhante à outras famílias, a família 2A não apresenta mecanismo bem definido. Semelhante a Família 5A, a Família 2A apresenta um domínio N-terminal MltA e o domínio catalítico 3D na região C-terminal, o que sugere que essa proteína está relacionada a reciclagem de muropeptídeos durante a elongação e divisão celular (Powell et al., 2006). Em *N. gonorrhoeae*, uma mutação no domínio 3D mostrou incapacidade das cepas para completar a separação em células filhas durante a divisão bacteriana (Cloud e Dillard, 2004), entretanto o mesmo fenótipo não foi observado em cepas mutantes de *E. coli* (Lommatzsch et al., 1997). Nesse sentido, são necessários mais estudos para determinar o mecanismo e papel das LTs da família 2A. Porém, o presumido papel das LTs da família 2A relacionada com a divisão celular, também pode ser realizada por LTs da família 6A, que foram identificadas em *XccA*, sugerindo redundância funcional.

A família 4A está relacionada a lisozima de bacteriófagos e também a montagem do SST4 (Walmagh et al., 2013), assim como descrito para a subfamília 1G, identificada em *XccA*. As LTs da família 4 apresentam um domínio único anotado como Phage_Lysozyme, relacionado ao ciclo lítico do bacteriófago lambda (Fokine et al., 2008). A *XccA* apresenta diversas regiões de profagos integrados em seu genoma, porém nenhuma dessas apresenta similaridade com bacteriófagos lambda, tão pouco genes de fago apresentando o domínio Phage_Lysozyme (Varani et al., 2013). Assim

como outras famílias de LTs, a 4A ainda não tem seu mecanismo conhecido, sendo necessário mais estudos para determinar sua função.

Embora presuma-se que cada LT apresente um mecanismo específico, a ausência das famílias 2A e 4A pode ser explicada pela redundância funcional desempenhada por outras LTs presente no genoma de *XccA* (Scheurwater et al., 2008).

Como resultado adicional, foi encontrado o gene *XAC_RS15470*, uma transglicosilase de biossíntese denominada peptidoglicano monofuncional biossintético (MtgA), envolvida na biossíntese de peptidoglicanos (Spratt et al., 1996). A biossíntese de peptidoglicanos é estritamente relacionada aos processos de morfogênese, citocinese (Popham e Young, 2003) e integridade celular (Van Heijenoort, 2001). Estes processos são catalisados por proteínas de ligação à penicilina (PBPs), que podem ser classe A, cuja ligação ocorre na porção N-terminal e apresenta atividade transpeptidase, ou classe B, ligação na porção C-terminal e atividade glicosiltransferase (GT) (Spratt et al., 1996). Em *E. coli* a proteína MtgA apresenta atividade GT e participa da biossíntese de peptidoglicano (Spratt et al., 1996; Bertsche et al., 2006). Em adição, tem sido sugerido que MtgA, pode desempenhar um papel secundário ainda desconhecido na síntese/remodelagem do peptidoglicano, que além disso é modulado por outras proteínas (Derouaux et al., 2008).

5.2 As LTs da família 3B *mltB2.1* e *mltB2.2* não são essenciais para a viabilidade de *XccA*, mas estão relacionadas com a progressão da doença

Os genes passageiros *mltB2.1* e *mltB2.2*, inseridos no transposon *TnXax1* da família *Tn3*, foram nocauteados para se obter mais informações sobre seu papel em relação a patogenicidade e virulência em *XccA*. Para tanto, os genes foram deletados individualmente pela técnica de mutação sítio dirigida (Materiais e Métodos) gerando os mutantes simples *mltB2.1*-pXAC64/ Δ *mltB2.1* (Δ *mltB2.1*) e *mltB2.2*/ Δ *mltB2.2* (Δ *mltB2.2*), respectivamente, e simultaneamente, gerando o mutante duplo Δ *mltB2.1*- Δ *mltB2.2* (Figura 8).

Afim de avaliar o efeito das deleções na patogenicidade de XccA, os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ foram inoculados em hospedeiro susceptível Laranja “Pêra Rio” (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pelos métodos de aspersão e infiltração (Figuras 9, 10, 11, e 12). Ao avaliar o desenvolvimento dos sintomas do CC no ensaio de infiltração, foi possível observar um atraso na evolução sintomas da doença para os mutantes $\Delta mltB2.1$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$, que apresentam apenas hiperplasia e encharcamento, enquanto a estirpe XccA e o mutante $\Delta mltB2.2$ apresentam necrose dos tecidos (Figuras 9, 10, 11). Já no teste de aspersão foi possível observar redução no tamanho e número das lesões (Figura 12). Essa diferença na observação dos sintomas pode ocorrer devido a diferença entre os métodos, enquanto os métodos de aspersão permitem que a bactéria use sua maquinaria para “penetrar” naturalmente os tecidos do hospedeiro, e utilizem também aberturas naturais, como estômatos e lesões, no método de infiltração por pressão, ocorre a destruição mecânica das barreiras físicas utilizadas como defesa primária pela planta: a cutícula e a parede celular do apoplasto das folhas, por essa razão, as suspensões infiltradas têm maior capacidade de causar sintomas do que os métodos de aspersão (Rigano et al., 2007). Juntos, estes resultados mostram que os genes *mltB2.1* e *mltB2.2* não são essenciais para a viabilidade da bactéria, fato também confirmado pelas curvas *ex planta* e *in planta* (Figura 13A, 13B), porém os mesmos estão estritamente relacionados com aumento da virulência e à progressão da doença.

Quando a bactéria se encontra dentro do espaço apoplástico, a bactéria adere-se a superfície do hospedeiro utilizando adesinas, o SST4 e o SST3, uma estrutura semelhante a uma agulha, que abrange ambas as membranas, permitindo a conexão entre patógeno e hospedeiro (Buttner e Bonas, 2010). Para que ocorra a inserção do aparato de secreção do SST3 é necessário que antes ocorra síntese e remodelagem da membrana celular, sendo esta tarefa realizada pelas LTs (Koraimann, 2003; Scheurwater et al., 2008). Nesse sentido, sugerimos que o atraso observado na progressão dos sintomas do CC observados neste trabalho nas Figuras 9, 10, 11 e 12 ocorra devido a um efeito direto da LT MltB2 na montagem do SST3, que indiretamente afeta a translocação de proteínas efetoras.

Já foi previsto em outros trabalhos que a atividade de MltB2.1 é semelhante a HopaJ1 de *P. seryngae*, relatada como atuando na quebra do peptidoglicano para a montagem do SST3 e contribuindo para a translocação de proteínas efetoras (Oh et

al., 2007). Resultados semelhantes entre o SST3 e as LTs também foram relatados em outros trabalhos realizados com patógenos de plantas e animais (sumarizados na Tabela 6).

Tabela 6. LTs associadas ao SST3 em patógenos de plantas e animais.

LT	Organismo	Características ou contribuição para o SST3 e virulência/patogenicidade	Referencias
EtgA	EPEC	Localizada no periplasma; degrada peptidoglicano; contribui para o SST3	(Garcia-Gomez et al., 2011)
HpaH	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Localiza-se no periplasma; atividade LT; Contribui para virulência e SST3; promove a translocação de efetores do Sistema de secreção	(Buttner et al., 2007; Hausner et al., 2017)
HpaH	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	Contribui para virulência e HR	(Noël L. ; Thieme F.; Nennstiel D. ; Bonas, 2002)
Hpa2	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	Relacionada a virulência; atividade LT demonstrada; lise da parede bacteriana	(Zhang et al., 2008)
Hpa2	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	Contribui para virulência e translocação de efetores; interage com o translocon <i>hrpF</i> ; secretado pelo SST3	(Li et al., 2011b)
HrpH	<i>P. syringae</i>	Contribui para translocação de efetores pelo SST3	(Oh et al., 2007)
HopP1	<i>P. syringae</i>	Pode contribuir para a translocação de efetores; associado a supressão da resposta imune do hospedeiro; contribui para translocação de efetores pelo SST3	(Oh et al., 2007)
HopAJ1	<i>P. syringae</i>	Pode contribuir para a translocação de efetores	(Oh et al., 2007)
MltB2.1	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i> 306 A	Relacionada a virulência e patogenicidade; pode contribuir para a translocação de efetores	(Laia et al., 2009)
IpgF	<i>S. flexneri</i> pWR100	Relacionada a quebra do peptidoglicano, pode contribuir para a translocação de efetores	(Bertsche et al., 2006)
IagB	<i>Salmonella</i> SPI-1	Contribui para a translocação de efetores do SST3	(Sukhan et al., 2001).

A relação entre proteínas efetores e LTs já foi observada em *Xanthomonas*, pela LT HpaH da família 1G (Tabela 6) (Noël L. ; Thieme F.; Nennstiel D. ; Bonas, 2002; Zhang et al., 2008; Li e Wang, 2011; Li et al., 2011b; Hausner et al., 2017). Apesar de pertencerem a famílias diferentes das LTs (MltB2 pertencerem à família 3 e HpaH/Hpa2 à família 1G – Tabela 5) estas proteínas podem desempenhar papel semelhante devido a redundância funcional presente entre esta família de proteínas (Heidrich et al., 2002; Scheurwater et al., 2008; Dik et al., 2017).

Portanto, os resultados aqui obtidos corroboram com a hipótese que o nocaute de uma LT não contribui significativamente para abolir a secreção de efetores, portanto, da virulência (Garcia-Gomez et al., 2011). Como a maioria das bactérias codifica um número de LTs diferentes, é provável que a montagem dos complexos SST3 e SST4 possa continuar, ainda que de forma menos eficiente, por poros naturais ou quebras na camada de peptidoglicano por outras LTs (Scheurwater e Burrows, 2011). Portanto, ainda que não haja uma relação direta, as LTs *mltB2.1* e *mltB2.2* podem estar associados a translocação de efetores. No entanto a ausência destes genes não abole a doença, provavelmente devido a redundância funcional entre a família de LTs.

5.3 A diferença entre o número de cópias de *mltB2.1* e *mltB2.2* pode influir na expressão global gênica

A diferença sintomatológica observada entre os genes *mltB2.1* e *mltB2.2* (Figuras 9, 10, 11 e 12) pode estar relacionada a três fatores: diferença no nível de expressão dos dois genes; redução na atividade do gene cromossômico devido a diferença de um único aminoácido; ou uma diferença no número de cópias entre o gene plasmídeo e do cromossomo. No entanto, verificamos que não há diferença entre as sequências dentro do transposon *TnXax1*, portanto, é improvável que a expressão diferencial seja responsável. A provável região promotora (incluindo as regiões -35 e -10 localizadas “upstream” do códon de iniciação) dos genes *mltB2.1* e *mltB2.2* são idênticas. Quanto a diferença de um aminoácido nas proteínas MltB2.1 e MltB2.2, também parece improvável, pois essa troca ocorre fora dos domínios SLT2 e PG_binding_1 relacionados a atividade transglicosilase (Apêndice C). No entanto, algumas mutações sinônimas podem ter um efeito sobre a expressão no nível

translacional ou na estabilidade do mRNA, porém seriam necessários estudos envolvendo qRT-PCR para confirmar esta hipótese.

A verificação do número de cópias entre plasmídeo e cromossomo foi realizada, neste estudo, mostrando que há 3 plasmídeos por origem de replicação cromossômica, portanto, 3 plasmídeos por célula. Ao avaliar os fenótipos de todos os mutantes aqui obtidos, observa-se que a ausência de MltB2.1 ($\Delta mltB2.1$) não é suprida por MltB2.2, apoiando a hipótese que o aumento do número de cópias do gene presente no plasmídeo influi na expressão global de genes (Figura 9 e 12). Também pôde ser observado que na ausência de ambas cópias, MltB2.1 e MltB2.2 ($\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$), o fenótipo mostra-se semelhante à $\Delta mltB2.1$ (Figura 11 e 12), afirmando que a expressão de MltB2.1 supera a de MltB2.2, enquanto o fenótipo observado para o gene MltB2.2 ($\Delta mltB2.2$) presente no cromossomo assemelha-se ao isolado XccA (Figura 10 e 12).

Diante disso, o maior número de cópias do gene *mltB2.1*, presente no plasmídeo, pode ser o responsável por aumentar o nível global da expressão deste gene, em relação ao menor número de cópias do gene *mltB2.2*, encontrado no cromossomo. Em adição, sugerimos que o gene *mltB2.1* está diretamente relacionado ao aumento da patogenicidade em XccA, explicando os sintomas observados nos ensaios *in planta* (Figuras 9, 10, 11 e 12), corroborando a hipótese de que há uma pressão seletiva para manter o gene passageiro *mltB2* dentro das estruturas de TnXax1 (Ferreira et al., 2015).

5.4 O possível papel das transglicosilases MltB2 no atraso do cancro cítrico e contribuição para o *fitness*

Alguns dos principais fatores de virulência e patogenicidade em XccA incluem o SST3, SST2, formação de biofilme e goma xantana, “quorum-sensing” (QS) e diversos sistemas de dois componentes (TCS) (Buttner, 2012). Diante disso, a formação de biofilme, goma xantana e motilidades foram avaliadas na XccA e nos mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$.

A goma xantana é o principal exopolissacarídeo produzido pelas *Xanthomonaceae*, apresentando papel importante para a sobrevivência da bactéria (Rigano et al., 2007) e também para a virulência (Zimaro et al., 2014). Neste trabalho,

os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$, apresentaram produção pouco maior de goma xantana quando comparados à estirpe XccA (Figura 16). Fato semelhante foi observado em uma cepa mutante para o gene *oprB* ($Xcc\Delta oprB$) em XccA, que mostrou diminuição da formação de biofilme para a cepa mutante e alta produção de xantana, provavelmente em consequência do comprometimento da absorção de glicose pelo gene *oprB*, responsável por redirecionar o fluxo de carbono para a produção de xantana (Ficarra et al., 2017).

O biofilme e a autoagregação são características importantes relacionadas à virulência das bactérias, desempenhando papel fundamental durante as interações patógeno-hospedeiro (Rigano et al., 2007). O biofilme é vantajoso para a bactéria pois oferece proteção ao estresse ambiental, mecanismos de defesa do hospedeiro e compostos antimicrobianos (Malamud et al., 2011). Além disso, em XccA, o biofilme também é necessário para a virulência total (Zimaro et al., 2014). A ausência das LTs *mltB2.1* e *mltB2.2* em XccA levaram a redução na formação do biofilme bacteriano, quantificado nos meios NB, e meio mínimo XVM2 suplementado com glicose (Figuras 14A e 14B). Como a produção mais baixa de biofilme pode levar a uma redução na agregação celular (Rigano et al., 2007), também foi testada a capacidade dos mutantes e de XccA de formar agregados celulares. Os resultados aqui obtidos mostraram que XccA tem a capacidade de agregar um pouco mais que os mutantes (Figura 15), sugerindo que a bactéria passa a viver mais tempo em um estilo de vida planctônico, conseqüentemente influenciando na virulência da mesma.

Para colonizar ambientes e também para formação de um biofilme maduro, as bactérias utilizam de mecanismos de motilidade bacteriana (Malamud et al., 2011). As motilidades podem ser avaliadas de forma individual (“swimming”), e também pela motilidade em grupos (“swarming”), ambas dependentes de flagelo e fundamentais para a aderência inicial da bactéria na superfície da folha, desenvolvimento do biofilme e virulência (Malamud et al., 2011). Neste trabalho, os ensaios de motilidade realizados para XccA e para os mutantes $\Delta mltB2.1$, $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$ não mostraram diferença significativa (Figuras 17A e 17B). Este resultado sugere que as proteínas da família as LTs do transposon TnXax1 não estão envolvidas diretamente na montagem do flagelo e na motilidade bacteriana. De acordo com a classificação apresentada na Figura 5 e na Tabela 2, que a LT que realiza esta tarefa é a ORF XAC_RS13315 (*sltF*) da família 1F (Dik et al., 2017).

6 CONCLUSÕES

Os resultados aqui relatados indicam que LTs de diferentes famílias e subfamílias estão amplamente distribuídas no genoma de XccA. De 12 LTs identificadas, duas LTs, *mltB2.1* e *mltB2.2* foram selecionadas devido a sua presença como genes passageiros no transposon TnXax1 da família Tn3. Os resultados aqui obtidos indicam que os genes *mltB2.1* e *mltB2.2* não são essenciais para o desenvolvimento do CC, porém sugerem que a aquisição destes genes pelo elemento TnXax1 levou a uma vantagem adaptativa com relação ao acréscimo da virulência do patógeno. As LTs estão presentes durante todo o processo de remodelamento do peptidoglicano e montagem do aparato do SST3 e sua ausência gera consequências para a patogenicidade bacteriana. Mais estudos são necessários para determinar suas funções celulares específicas, seus reguladores de expressão e também sua estrutura tridimensional e atividade enzimática específica.

7 REFERÊNCIAS

ALLARD ST, GIRAUD MF, NAISMITH JH (2001) Epimerases: structure, function and mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences** 58:1650-65.

ALTSCHUL SF et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research** 25:3389-402.

AMARAL AM et al. (2005) Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira** 30:3.

ARENDS SJ et al. (2010) Discovery and characterization of three new *Escherichia coli* septal ring proteins that contain a SPOR domain: DamX, DedD, and RlpA. **Journal of Bacteriology** 192:242-55.

BECKER A et al. (1998) Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology** 50:145-52.

BERTSCHE U et al. (2006) Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. **Molecular Biology** 61:675-90.

BLACKBURN NT, CLARKE AJ (2001) Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. **Journal of Molecular Evolution** 52:78-84.

BOCH J, BONAS U (2010) *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. **Annual Review of Phytopathology** 48:419-36.

BOGDANOVA AJ, SCHORNACK S, LAHAYE T (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. **Current Opinion in Plant Biology** 13:394-401.

BONAS U, STALL RE, STASKAWICZ B (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Genetics and Genomics** 218:127-36.

BRANDA SS et al. (2005) Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology** 13:20-6.

BRUNINGS AM, GABRIEL DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology** 4:141-57.

BUTTNER D (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 76:262-310.

BUTTNER D, BONAS U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews** 34:107-33.

BUTTNER D et al. (2007) Characterization of the nonconserved *hpaB-hrpF* region in the *hrp* pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal** 20:1063-74.

CAPPELLETTI PA. 2010. **Identificação e Análise Funcional de Interações. Proteína-Proteína do Sistema de Secreção do Tipo III do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 190 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, USP.

CLOUD KA, DILLARD JP (2004) Mutation of a single lytic transglycosylase causes aberrant septation and inhibits cell separation of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Bacteriology** 186:7811-4.

COLETTA-FILHO HD et al. (2006) Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **Applied Microbiology and Biotechnology** 100:279-85.

CORNELIS GR (2000) Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London** 355:681-93.

COSTA TR et al. (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. **Nature Reviews Microbiology** 13:343-59.

COSTERTON JW et al. (1995) Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology** 49:711-45.

DA SILVA AC et al. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** 417:459-63.

DAS A, RANGARAJ N, SONTI RV (2009) Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal** 22:73-85.

DE LA MORA J et al. (2007) The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. **Journal of Bacteriology** 189:7998-8004.

DENG W et al. (2017) Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. **Nature Review Microbiology** 15:323-337.

DEROUAUX A et al. (2008) The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* localizes to the cell division site and interacts with penicillin-binding protein 3, FtsW, and FtsN. **Journal of Bacteriology** 190:1831-4.

DIK DA et al. (2017) Lytic transglycosylases: concinnity in concision of the bacterial cell wall. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology** 52:503-542.

DO AMARAL AM, TOLEDO, C.P., BAPTISTA, J.C. & MACHADO, M.A. (2005) Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by electroporation. **Fitopatologia Brasileira** 30:292-294.

DOMINGUEZ-GIL T et al. (2016) Renew or die: The molecular mechanisms of peptidoglycan recycling and antibiotic resistance in Gram-negative pathogens. **Drug Resistance Updates** 28:91-104.

DOW M, NEWMAN MA, VON ROEPENACK E (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annual Review of Phytopathology** 38:241-261.

DRAPER O et al. (2006) Topology of the VirB4 C terminus in the *Agrobacterium tumefaciens* VirB/D4 type IV secretion system. **The Journal of Biological Chemistry** 281:37628-35.

FACINCANI AP et al. (2014) Comparative proteomic analysis reveals that T3SS, Tfp, and xanthan gum are key factors in initial stages of *Citrus sinensis* infection by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Functional & Integrative Genomics** 14:205-17.

FAIR RJ, TOR Y (2014) Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspectives in Medicinal Chemistry** 6:25-64.

FERENCE CM et al. (2017) Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**

FERREIRA RM. 2014. **Identification and characterization of ISXax2, a TN3-like transposable element potentially related with the virulence and pathogenicity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 63 f. Tese (Doutorado) - Unesp, Jaboticabal.

FERREIRA RM et al. (2015) A TALE of transposition: Tn3-like transposons play a major role in the spread of pathogenicity determinants of *Xanthomonas citri* and other xanthomonads. **MBio** 6:e02505-14.

FERREIRA RM et al. (2016) Unravelling potential virulence factor candidates in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by secretome analysis. **PeerJ** 4:e1734.

FICARRA FA et al. (2017) *Xanthomonas citri* ssp. *citri* requires the outer membrane porin OprB for maximal virulence and biofilm formation. **Molecular Plant Pathology** 18:720-733.

FINN RD et al. (2017) InterPro in 2017-beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research** 45:D190-D199.

FOKINE A et al. (2008) Structure of the bacteriophage phi KZ lytic transglycosylase *gp144*. **The Journal of Biological Chemistry** 283:7242-50.

FROST LS et al. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology** 3:722-32.

GALAN JE et al. (2014) Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. **Annual Review of Microbiology** 68:415-38.

GARCIA-GOMEZ E et al. (2011) The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion. **Microbiology** 157:1145-60.

GHOSH P (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 68:771-95.

GOCHEZ AM et al. (2018) Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. **BMC Genomics** 19:16.

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

HAUSNER J et al. (2017) The Predicted Lytic Transglycosylase HpaH from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Associates with the Type III Secretion System and Promotes Effector Protein Translocation. **Infection and Immunity** 85:e00788-16.

HEFFRON JD, ORSBURN B, POPHAM DL (2009) Roles of germination-specific lytic enzymes CwlJ and SleB in *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology** 191:2237-47.

HEIDRICH C et al. (2002) Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** 184:6093-9.

HERLIHEY FA, CLARKE AJ (2017) Controlling Autolysis During Flagella Insertion in Gram-Negative Bacteria. **Advances in Experimental Medicine and Biology** 925:41-56.

HOLTJE JV (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62:181-203.

HOLTJE JV et al. (1975) Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** 124:1067-76.

HU Y et al. (2014) Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. **Proc Natl Acad Sci U S A** 111:E521-9.

JACOBS C et al. (1994) Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for beta-lactamase induction. **The EMBO Journal** 13:4684-94.

JALAN N et al. (2013) Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics** 14:551.

JALAN NY, Q.; KOGENARU, S.; GUO, Y.; JONES, J. B.; GRAHAM, J.; WANG, Y. **Gnomic of Plant-Associated Bacteria**. Springer Berlin Heidelberg, Editors: Dennis C. Gross, Ann Lichens-Park, Chittaranjan Kole, 2014. 23.

JORGENSON MA et al. (2014) The bacterial septal ring protein RlpA is a lytic transglycosylase that contributes to rod shape and daughter cell separation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Biology** 93:113-28.

KANIGA KD, I.; CORNELIS, GR . (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. **Gene- Elsevier** 109: 137-141

KORAIMANN G (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. **Cellular and Molecular Life Sciences** 60:2371-88.

LACERDA LA et al. (2017) Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid** 90:44-52.

LAIA ML et al. (2009) New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology** 9:12.

LANGMEAD B, SALZBERG SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods** 9:357-9.

LARKIN MA et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics** 23:2947-8.

LEE J et al. (2004) Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. **Biotechniques** 36:398-400.

LEE M et al. (2013) Cell-wall remodeling by the zinc-protease AmpDh3 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the American Chemical Society** 135:12604-7.

LI H et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics** 25:2078-9.

LI J, WANG N (2011) The *wxacO* gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. **Molecular Plant Pathology** 12:381-96.

LI YR et al. (2011a) Hpa2 required by HrpF to translocate *Xanthomonas oryzae* transcriptional activator-like effectors into rice for pathogenicity. **Appl Environ Microbiol** 77:3809-18.

LIMA WC, VAN SLUYS MA, MENCK CF (2005) Non-gamma-proteobacteria gene islands contribute to the *Xanthomonas* genome. **OMICS** 9:160-72.

LIU SL et al. (1999) Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. **Journal of Bacteriology** 181:6747-55.

LOMMATZSCH J et al. (1997) Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology** 179:5465-70.

LOVERING AL, SAFADI SS, STRYNADKA NC (2012) Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly. **Annual Review of Biochemistry** 81:451-78.

MALAMUD F et al. (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology** 157:819-29.

MONTEIRO-VITORELLO CB et al. (2005) Xylella and *Xanthomonas* Mobil'omics. **OMICS** 9:146-59.

MOREIRA LM et al. (2010) Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics** 11:238.

MULDER L et al. (2006) LysM domains of Medicago truncatula NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. **Glycobiology** 16:801-9.

NIU XN et al. (2015) Complete sequence and detailed analysis of the first indigenous plasmid from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **BMC Microbiology** 15:233.

NOËL L. ; THIEME F.; NENNSTIEL D. ; BONAS U (2002) Two Novel Type III-Secreted Proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* Are Encoded within the *hrp* Pathogenicity Island. **Journal of Bacteriology** 184:8.

OH HS et al. (2007) *Pseudomonas syringae* lytic transglycosylases coregulated with the type III secretion system contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. **Journal of Bacteriology** 189:8277-89.

PFEILMEIER S, CALY DL, MALONE JG (2016) Bacterial pathogenesis of plants: future challenges from a microbial perspective: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology. **Molecular Plant Pathology** 17:1298-313.

POPHAM DL, YOUNG KD (2003) Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. **Current Opinion in Microbiology** 6:594-9.

POTHIER JF et al. (2011) The ubiquitous plasmid pXap41 in the invasive phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*: complete sequence and comparative genomic analysis. **FEMS Microbiol Letters** 323:52-60.

POWELL AJ et al. (2006) Crystal structures of the lytic transglycosylase MltA from *N.gonorrhoeae* and *E.coli*: insights into interdomain movements and substrate binding. **Journal of Molecular Biology** 359:122-36.

RAETZ CR, WHITFIELD C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry** 71:635-700.

RAGLAND SA et al. (2017) Two lytic transglycosylases in *Neisseria gonorrhoeae* impart resistance to killing by lysozyme and human neutrophils. **Cellular Microbiology** 19: e12662.

RIGANO LA et al. (2007) Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 20:1222-30.

RYAN RP et al. (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. **Nature Reviews Microbiology** 9:344-55.

SAMBROOK J, FRITSCHI EF, MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. 1989. 1,626 pp

SANTIN YG, CASCALES E (2017) Domestication of a housekeeping transglycosylase for assembly of a Type VI secretion system. **EMBO Reports** 18:138-149.

SCHEURWATER E, REID CW, CLARKE AJ (2008) Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 40:586-91.

SCHEURWATER EM, BURROWS LL (2011) Maintaining network security: how macromolecular structures cross the peptidoglycan layer. **FEMS Microbiology Letters** 318:1-9.

SIEBER KB, BROMLEY RE, DUNNING HOTOPP JC (2017) Lateral gene transfer between prokaryotes and eukaryotes. **Experimental Cell Research** 358:421-426.

SN HO HH, RM HORTON, JK PULLEN, LR PEASE (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene- Elsevier** 77:51-59

SPRATT BG et al. (1996) Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylases. **Molecular Biology** 19:639-40.

SUKHAN A et al. (2001) Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex. **J Bacteriol** 183:1159-67.

TAMPAKAKI AP et al. (2004) Conserved features of type III secretion. **Cellular Microbiology** 6:805-16.

VAN HEIJENOORT J (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. **Glycobiology** 11:25R-36R.

VARANI AM et al. (2013) The role of prophage in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 51:429-51.

WALMAGH M et al. (2013) Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. **Applied Microbiology and Biotechnology** 97:4369-75.

WILLIAMS AH et al. (2017) Bulgecin A: The key to a broad-spectrum inhibitor that targets lytic transglycosylases. **Antibiotics (Basel)** 6:

YAN Q, WANG N (2011) The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Bacteriology** 193:1590-9.

YUNCK R, CHO H, BERNHARDT TG (2016) Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. **Molecular Biology** 99:700-18.









ZAHRL D et al. (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. **Microbiology** 151:3455-67.

ZHANG J et al. (2008) A conserved Hpa2 protein has lytic activity against the bacterial cell wall in phytopathogenic *Xanthomonas oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology** 79:605-16.

ZIMARO T et al. (2014) The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. **BMC Microbiology** 14:96.

APÊNDICE

Apêndice A. Pesquisa das LTs em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 A, utilizando o banco de dados NCBI.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> mlt ID: 1158494	lytic murein transglycosylase [<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306]  discontinued	NC_003922.1 (3862..5139, complement)	XACb0007
<input type="checkbox"/> mltA ID: 1158240	transglycosylase associated protein [<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306]  discontinued	NC_003919.1 (4903648..4903899)	XAC4169
<input type="checkbox"/> slt ID: 1157632	soluble lytic murein transglycosylase [<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306]  discontinued	NC_003919.1 (4223637..4225742)	XAC3561
<input type="checkbox"/> mltB ID: 1157296	transglycosylase [<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306]  discontinued	NC_003919.1 (3798986..3800263, complement)	XAC3225
<input type="checkbox"/> mtgA ID: 1157118	monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase [<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306]  discontinued	NC_003919.1 (3564980..3565720, complement)	XAC3047
<input type="checkbox"/> dniR ID: 1156800	membrane-bound lytic murein transglycosylase D [<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306]  discontinued	NC_003919.1 (3190523..3191935, complement)	XAC2729
<input type="checkbox"/> yjbJ ID: 1156529	soluble lytic murein transglycosylase [<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306]  discontinued	NC_003919.1 (2862053..2863036, complement)	XAC2458
<input type="checkbox"/> mltB ID: 1154733	membrane-bound lytic transglycosylase [<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306]  discontinued	NC_003919.1 (785110..786249)	XAC0662

Apêndice B. Condições das reações de PCRs e digestões utilizadas para a mutação sítio-dirigida da ORF *XAC_RS16355*.

Apêndice B1. Concentrações dos reagentes para as PCRs A-B, C-D e A-D, em um volume final de 20µL.

PCR	Reagentes	Concentrações
A-B C-D A-D	Buffer GC	1X
	dNTP	200µM
	Oligonucleotídeo Foward	0,5µM
	Oligonucleotídeo Reverse	0,5µM
	DNA (genômico)	200ng
	DMSO	3%
	Taq Polimerase Phusion	0,4U
PCR de colônia	Buffer	1X
	dNTP	200µM
	Oligonucleotídeo A	0,5µM
	Oligonucleotídeo D	0,5µM
	DNA*	-----
	MgCl ₂	1,5mM
	Go Taq Polymerase (Promega)	1U
PCR com oligonucleotídeos específicos (Tabela 4A)	Buffer	1X
	dNTP	200µM
	Oligonucleotídeo F_RS22275/A	0,5µM
	Oligonucleotídeo D	0,5µM
	DNA (genômico)	200ng
	MgCl ₂	1,5mM
	Go Taq Polymerase (Promega)	1U

PCR = *Polymerase Chain Reaction*; dNTP = desoxirribonucleotídeos trifosfatos; DMSO = dimetilsulfóxido.

*Adicionado 4µL de DNA lisado.

Apêndice B2. Condições de PCR utilizadas para obtenção dos mutantes $\Delta mltB2.2$ e $\Delta mltB2.1-\Delta mltB2.2$.

PCR (Tabela 3)		Temperatura	Tempo	Quantidade
A-B	Desnaturação Inicial	98°C	30seg	1
	Ciclos	98°C	10seg	30
		68°C	15seg	
		72°C	30seg	
Extensão Final	72°C	10min	1	
C-D	Desnaturação Inicial	98°C	30seg	1
	Ciclos	98°C	10seg	30
		64°C	15seg	
		72°C	30seg	
Extensão Final	72°C	10min	1	
A-D	Desnaturação Inicial	98°C	30seg	1
	Ciclos	98°C	10seg	30
		70°C	15seg	
		72°C	30seg	
Extensão Final	72°C	10min	1	

*Todas as reações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Apêndice B3. Reações de PCR realizadas para confirmação da mutação realizada em XccA.

PCR de colônia Oligonucleotídeos A-D (Tabela 3)	Desnaturação Inicial	95°C	60seg	1
	Ciclos	95°C	30seg	30
		61°C	30seg	
		72°C	30seg	
Extensão Final	72°C	10min	1	
PCR específica <i>XAC_RS22275</i> (Tabela 4A)	Desnaturação Inicial	95°C	60seg	1
	Ciclos	95°C	30seg	30
		68°C	30seg	
		72°C	30seg	
Extensão Final	72°C	10min	1	
PCR específica <i>XAC_RS16355</i> (Tabela 4A)	Desnaturação Inicial	95°C	60seg	1
	Ciclos	95°C	30seg	30
		67°C	30seg	
		72°C	30seg	
Extensão Final	72°C	10min	1	
PCR para <i>Xanthomonas</i> <i>citri</i> subsp. <i>citri</i> Xac01 e Xac02 (Tabela 4B)	Desnaturação Inicial	95°C	60seg	1
	Ciclos	95°C	30seg	25
		65°C	30seg	
		72°C	30seg	
Extensão Final	72°C	10min	1	
PCR primers pNPTS138 M13 Forward – 40 M13 Reverse -48 (Tabela 4C)	Desnaturação Inicial	95°C	60seg	1
	Ciclos	95°C	30seg	25
		48°C	30seg	
		72°C	30seg	
Extensão Final	72°C	10min	1	

*Todas as reações foram realizadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700.

Apêndice B4. Condições das digestões e Ligação utilizadas neste trabalho.

Digestão vetor	
Reagentes	Concentração
Vetor pNPTS138	10µg
Enzima NheI (<i>New England BioLabs inc</i> ®)	30U
Enzima HindIII (Promega)	40U
Buffer B (Promega)	1X
BSA	0,1mg/µL
H ₂ O q.s.p. 60µL	-
Digestão inserto	
Reagentes	Concentração
Inserto (AD)	1,5µg
Enzima NheI (<i>New England BioLabs inc</i> ®)	1U
Enzima HindIII (Promega)	1U
Buffer B (Promega)	1X
BSA	0,1mg/µL
H ₂ O q.s.p. 60µL	-
Reação de ligação entre o vetor e o inserto	
Reagentes	Concentração
Inserto AD	300ng
Vetor pNPTS138	118ng
Buffer	1X
T4 Ligase (<i>New England BioLabs inc</i> ®)	400U
H ₂ O q.s.p. 20µL	-
Incubação	24 horas 37°C
Inativação	20 min 80°C

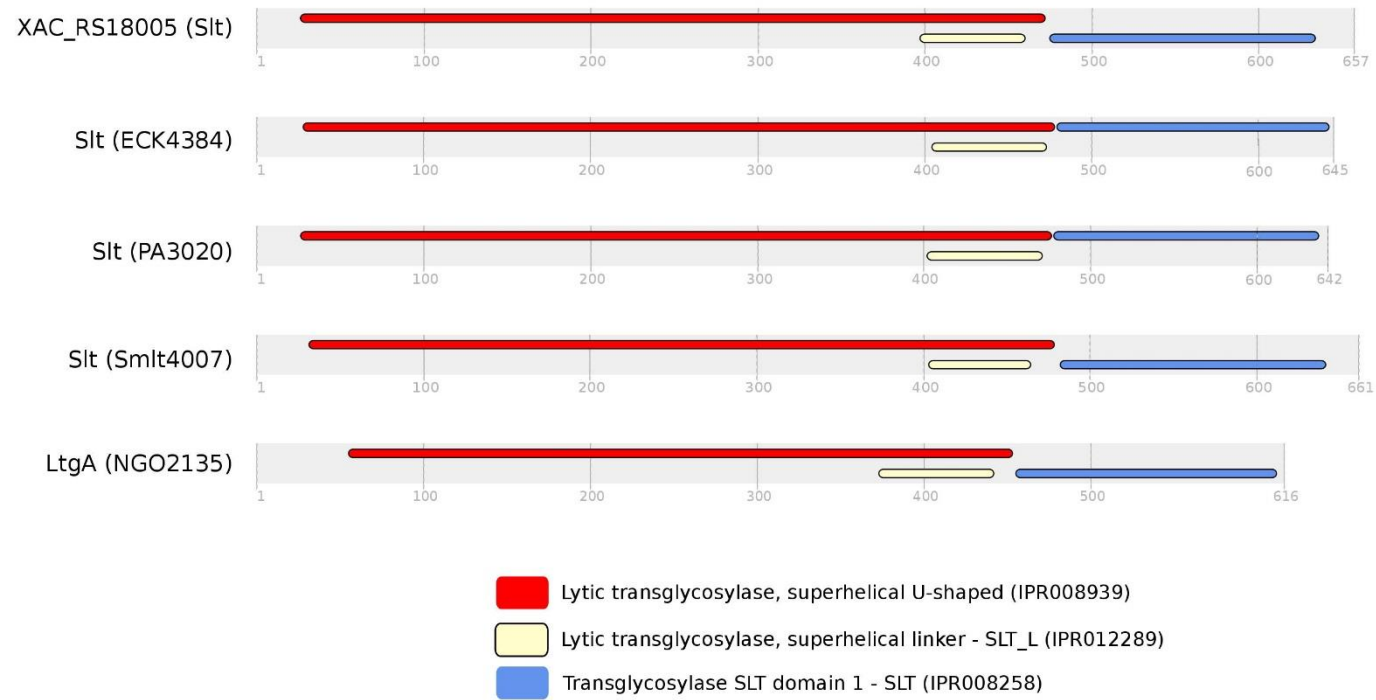
*Todas as reações foram realizadas em equipamentos de banho maria Memmert as temperaturas indicada pelos fabricantes das enzimas.

Apêndice C. Alinhamento de aminoácidos para as LTs de XccA.

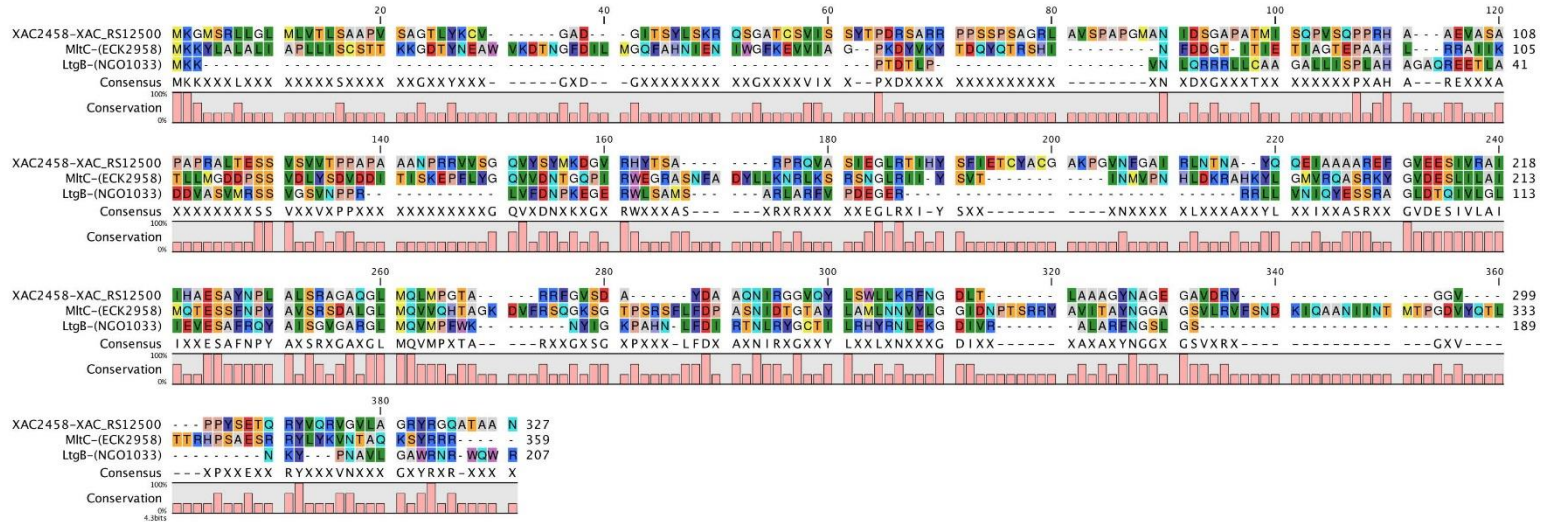
Family 1A - Alignment



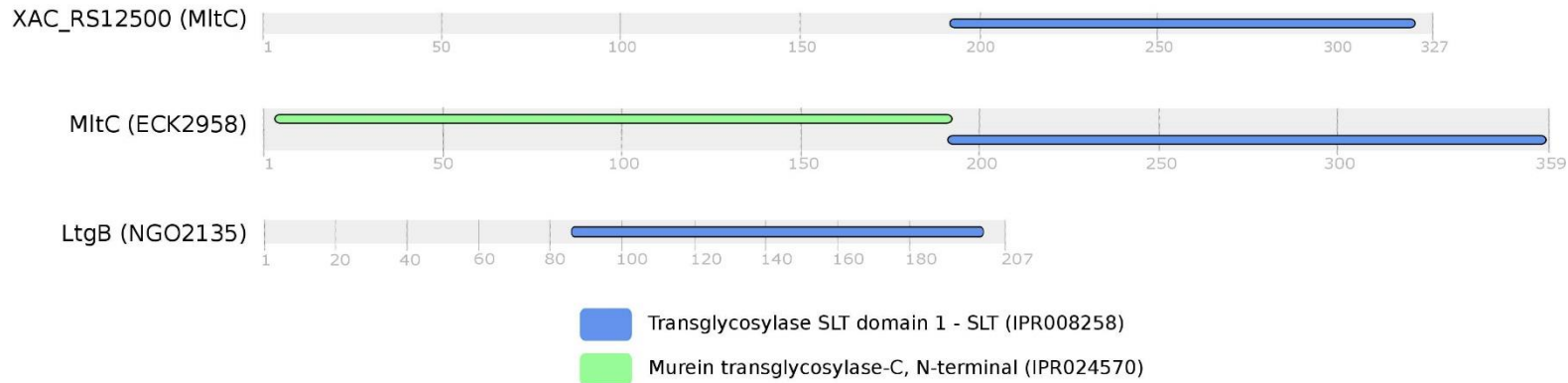
Family 1A - Domain architecture



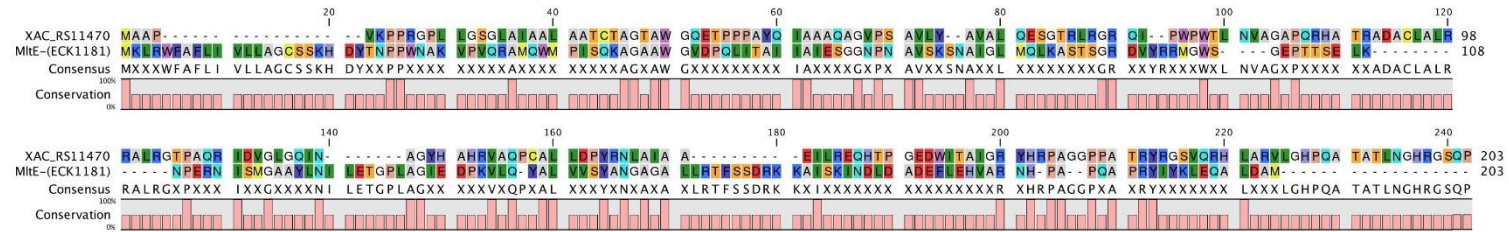
Family 1B - Alignment



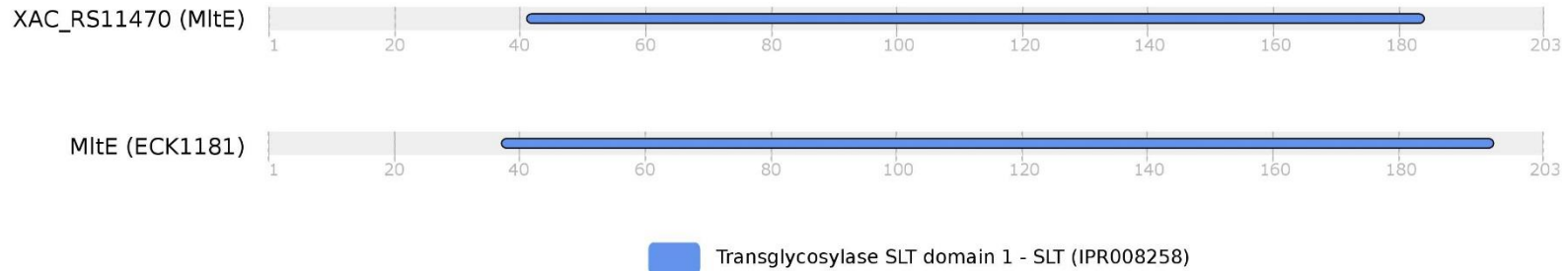
Family 1B - Domain architecture



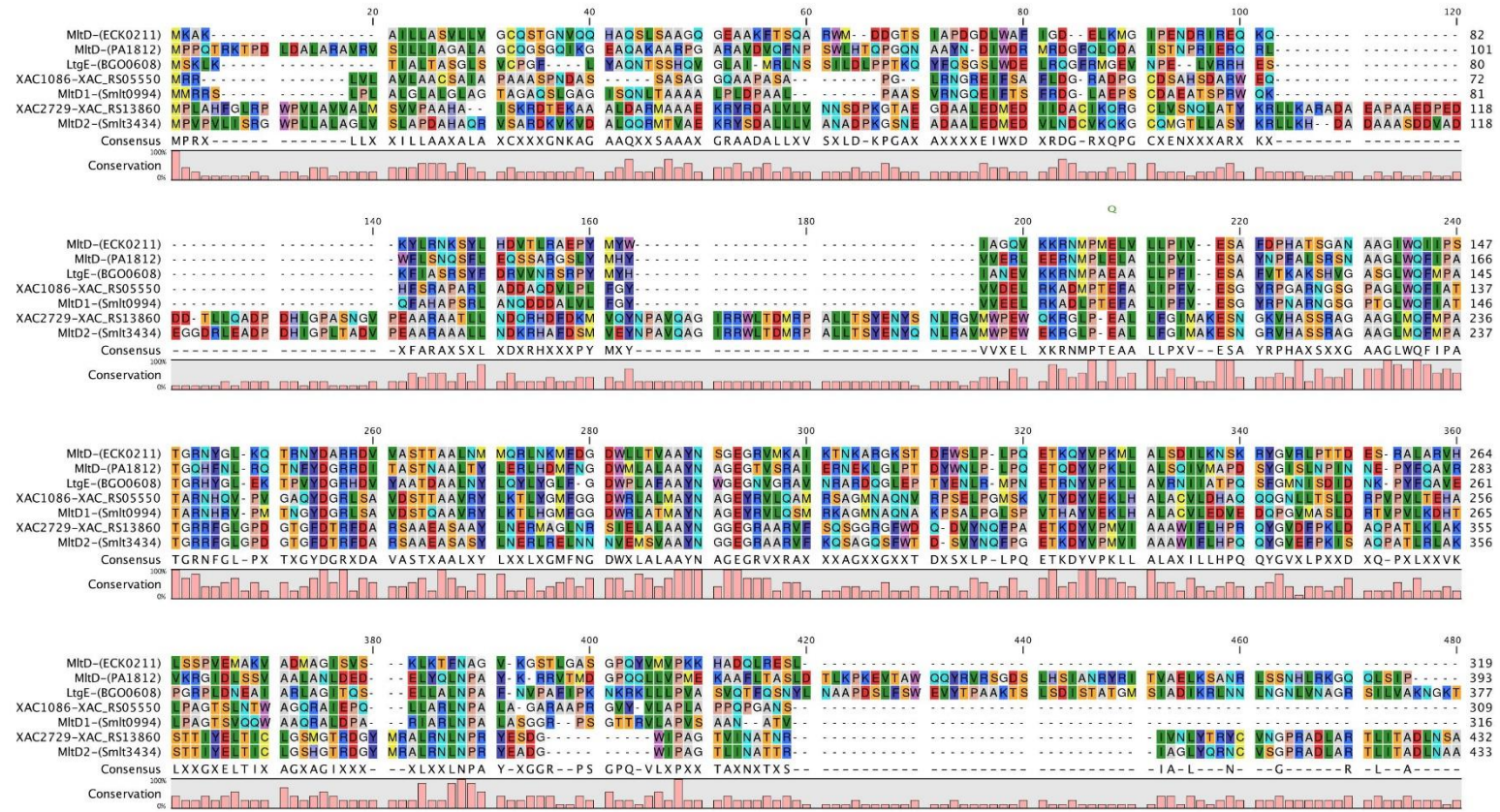
Family 1C - Alignment



Family 1B - Domain architecture

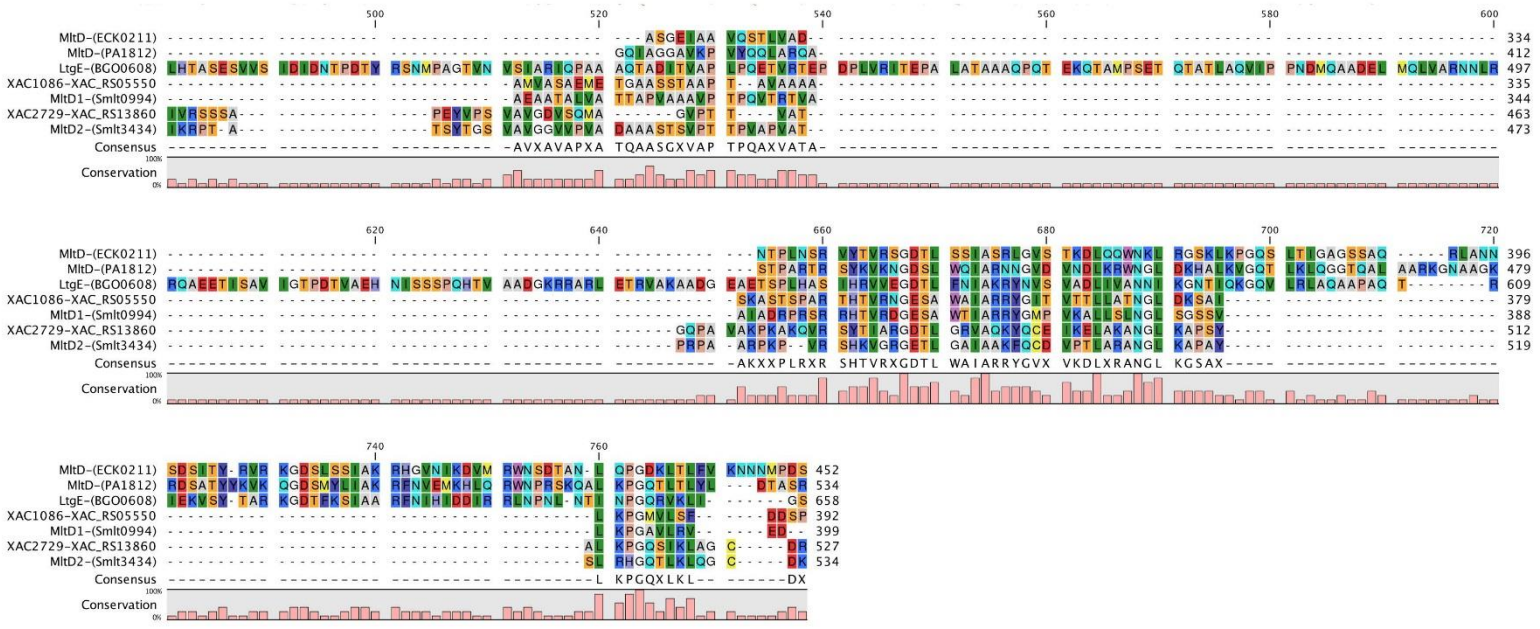


Family 1D - Alignment

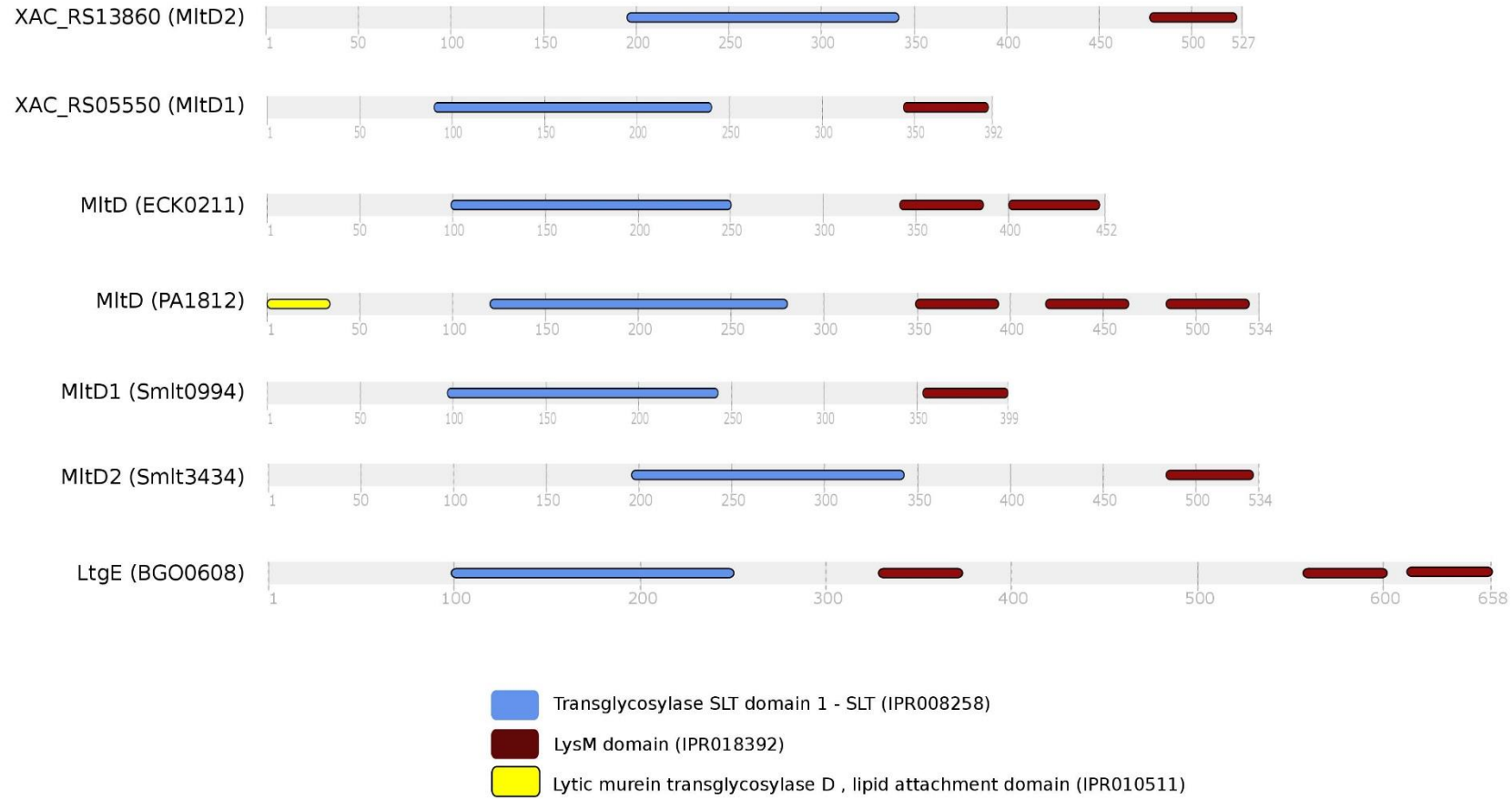


continue in the next page

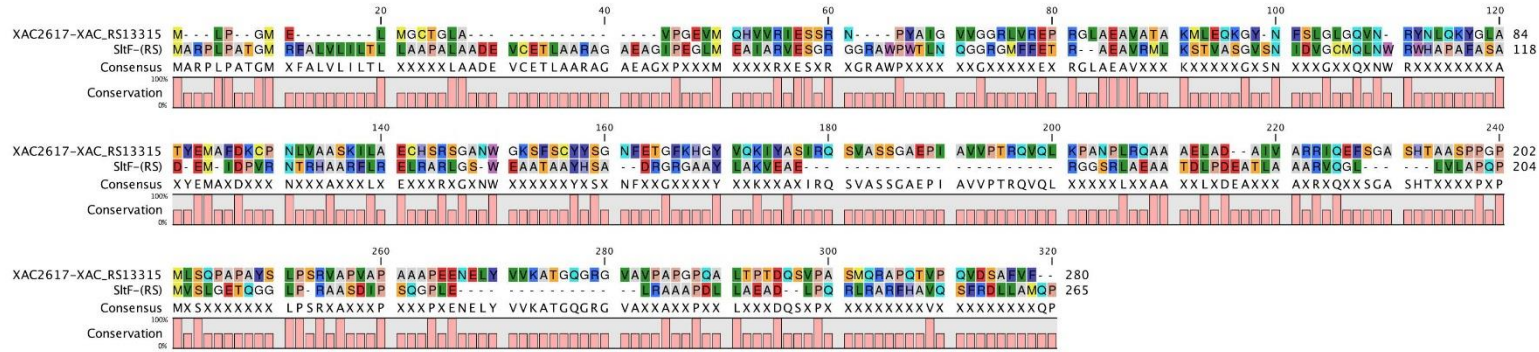
Family 1D - Alignment



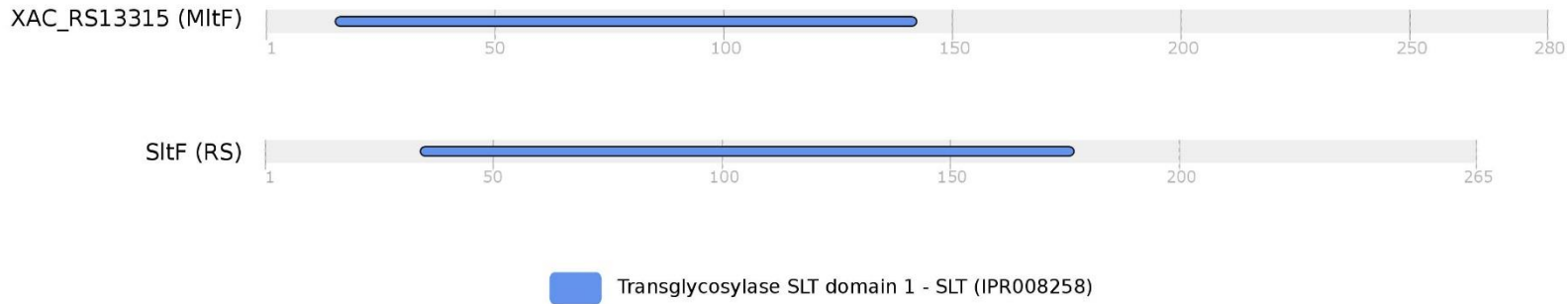
Family 1D - Domain architecture



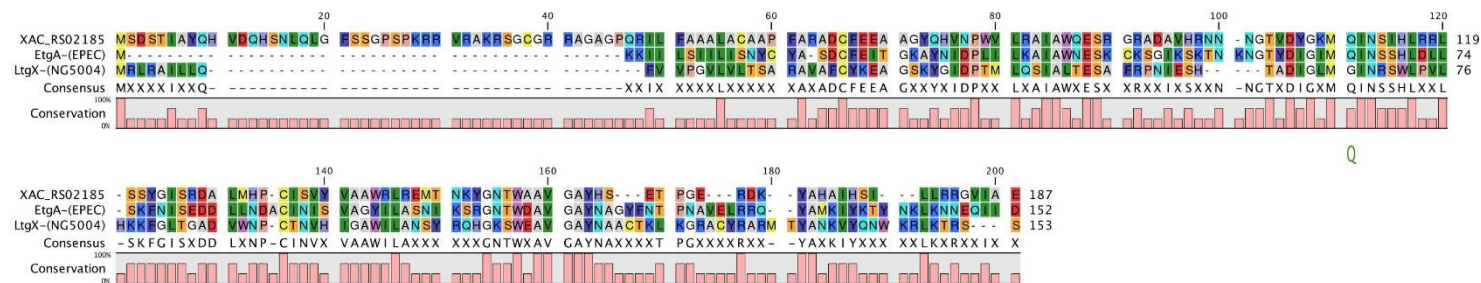
Family 1F - Alignment



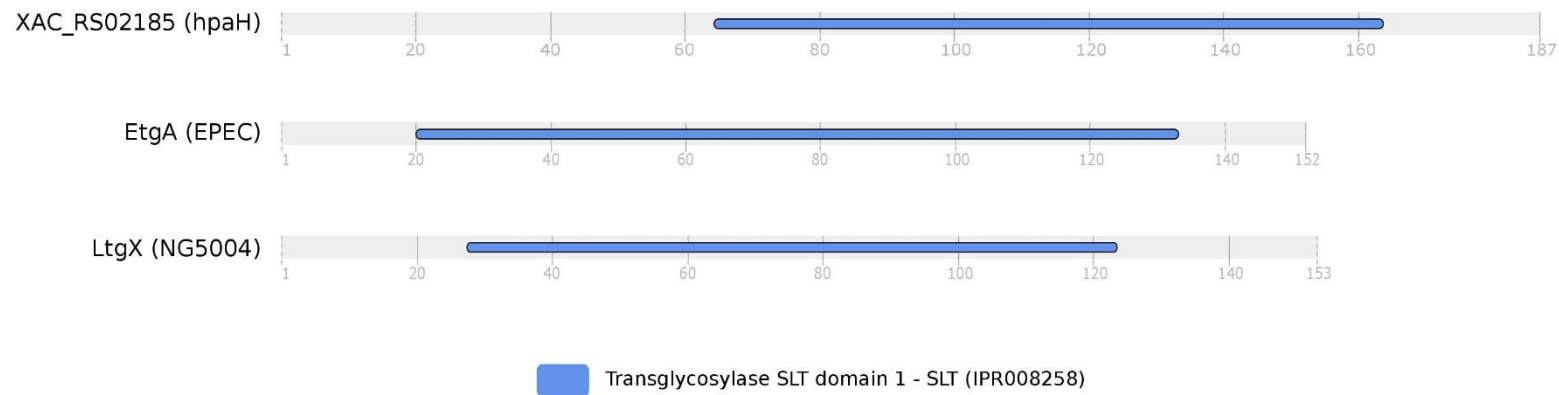
Family 1F - Domain architecture



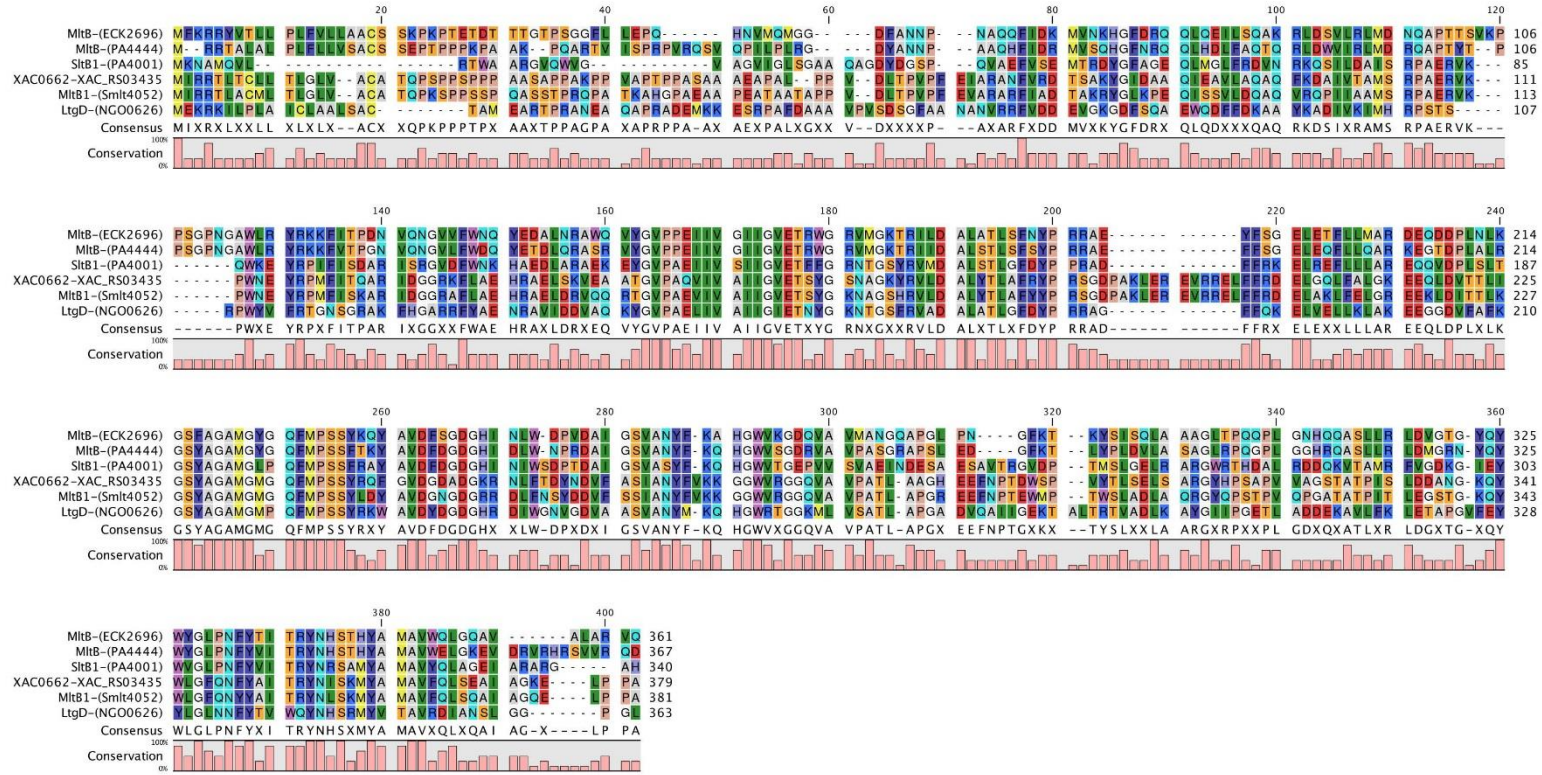
Family 1G - Alignment



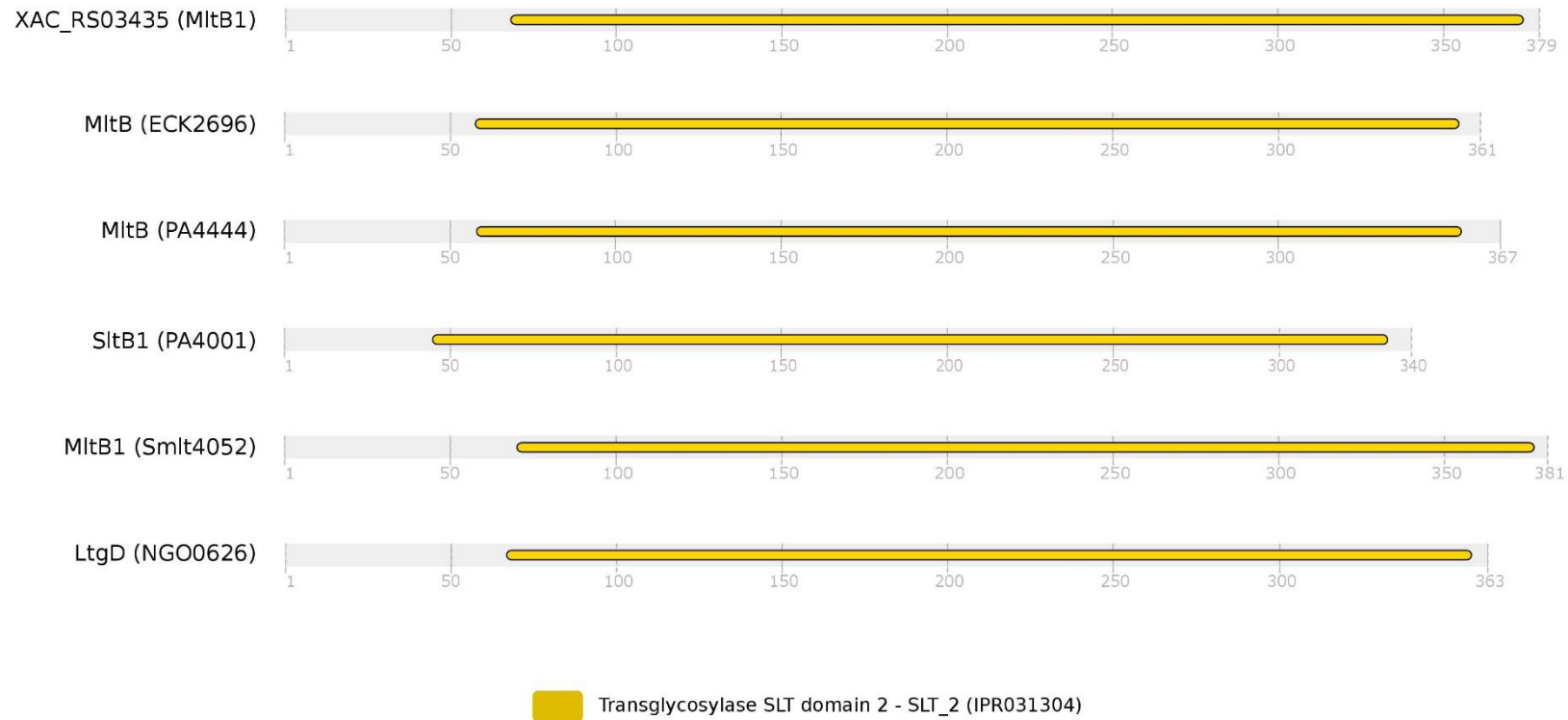
Family 1G - Domain architecture



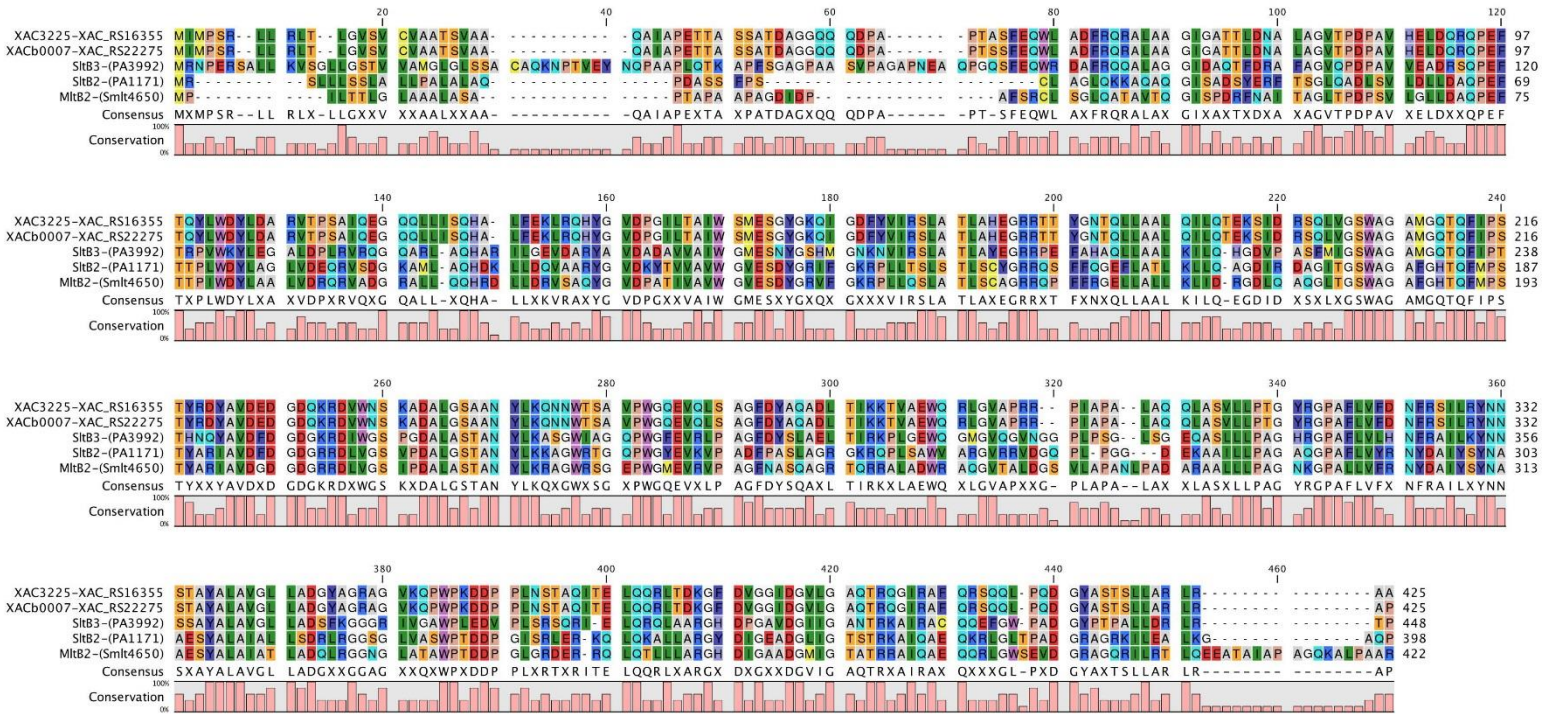
Family 3A - Alignment



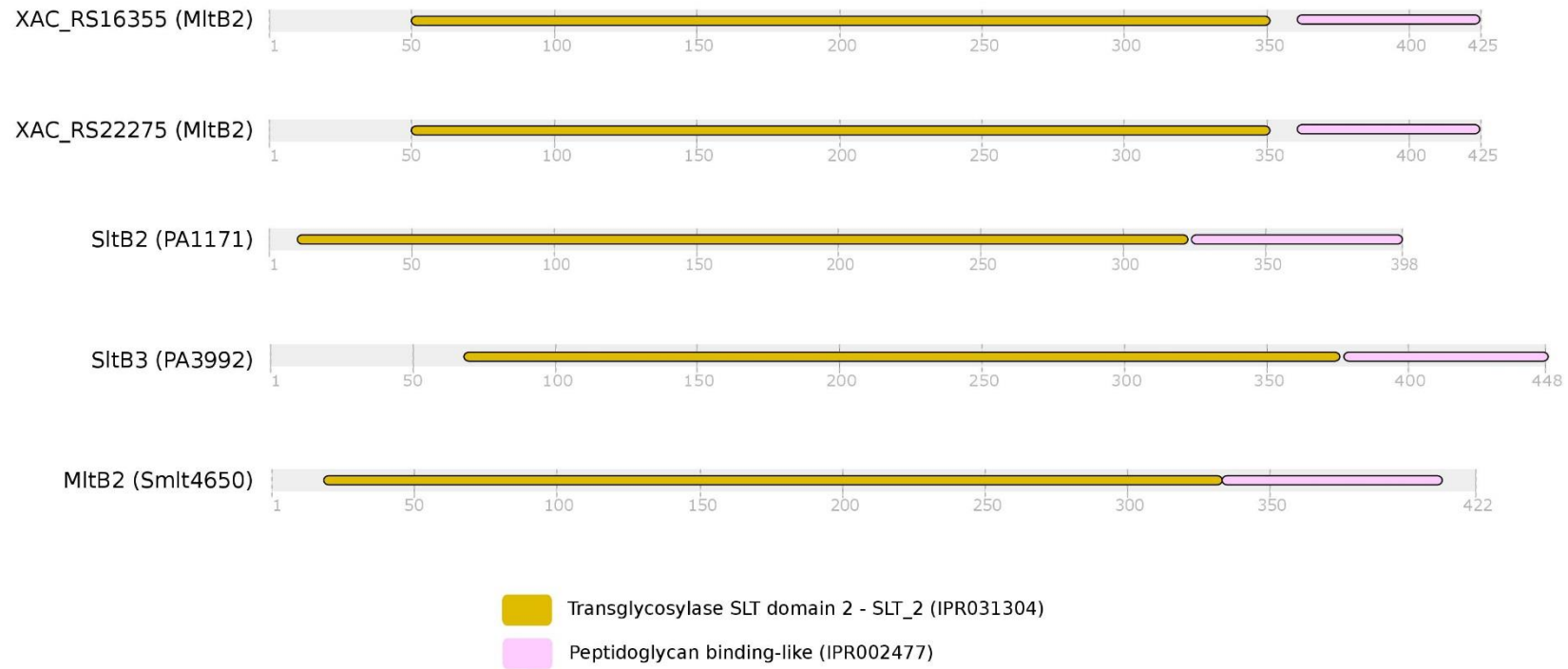
Family 3A - Domain architecture



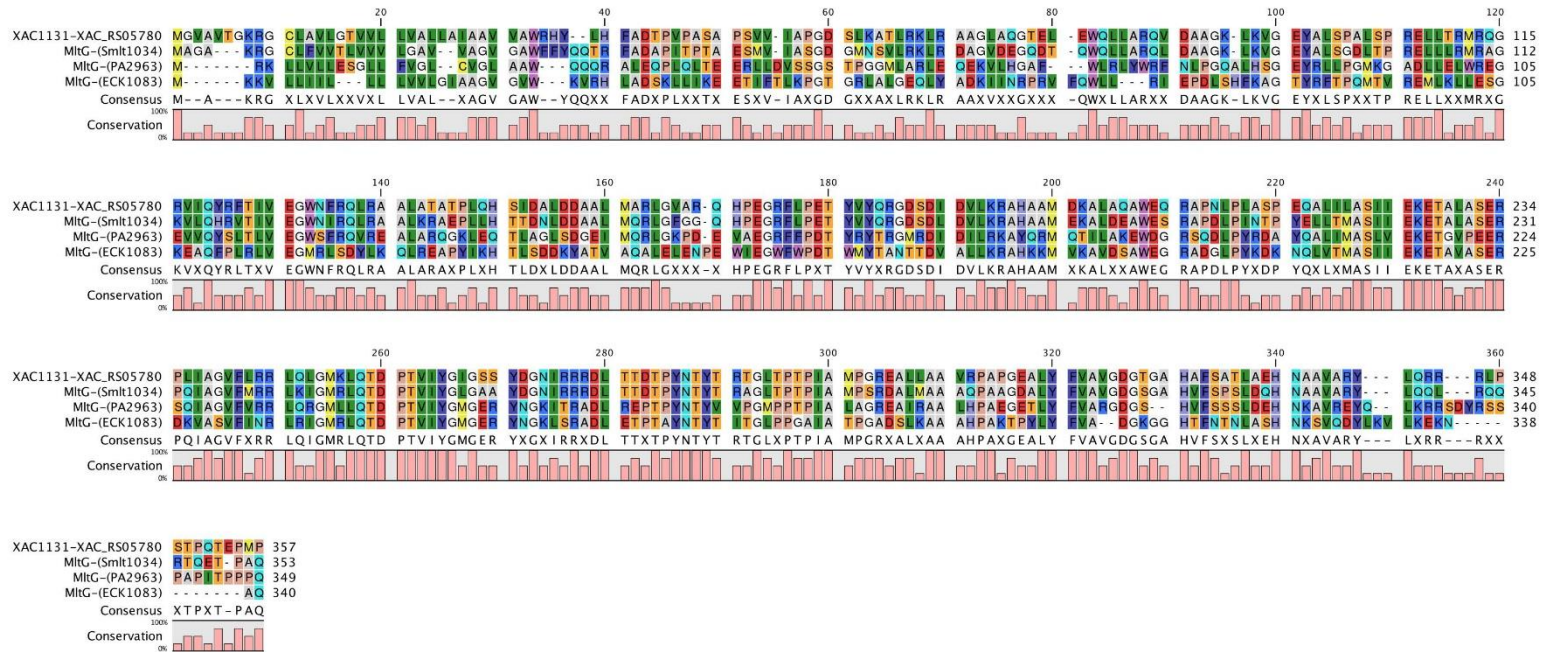
Family 3B - Alignment



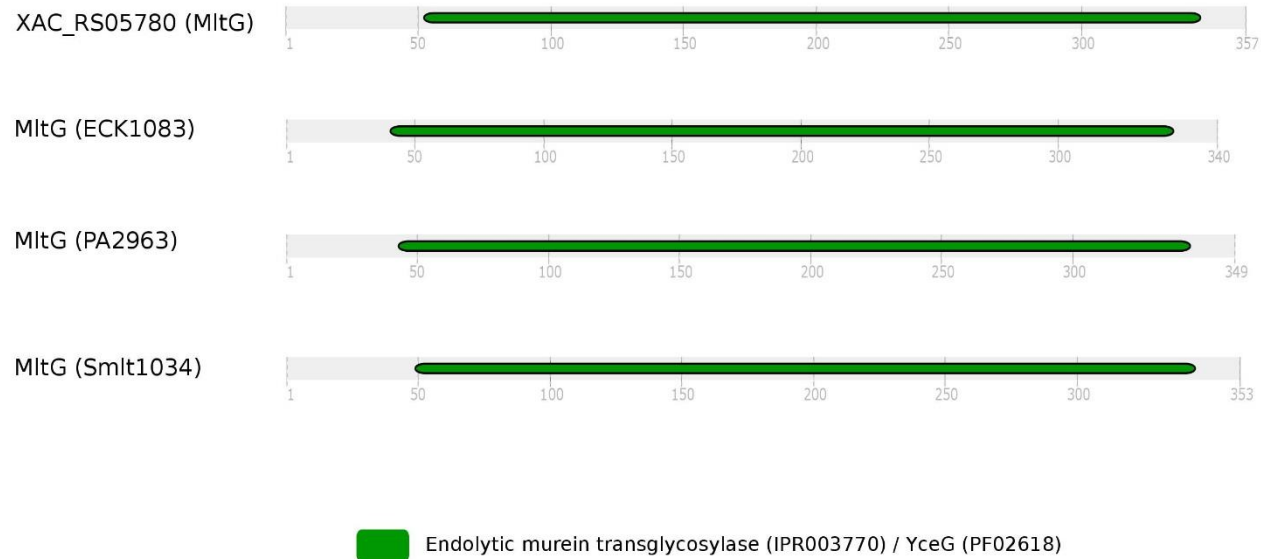
Family 3B - Domain architecture



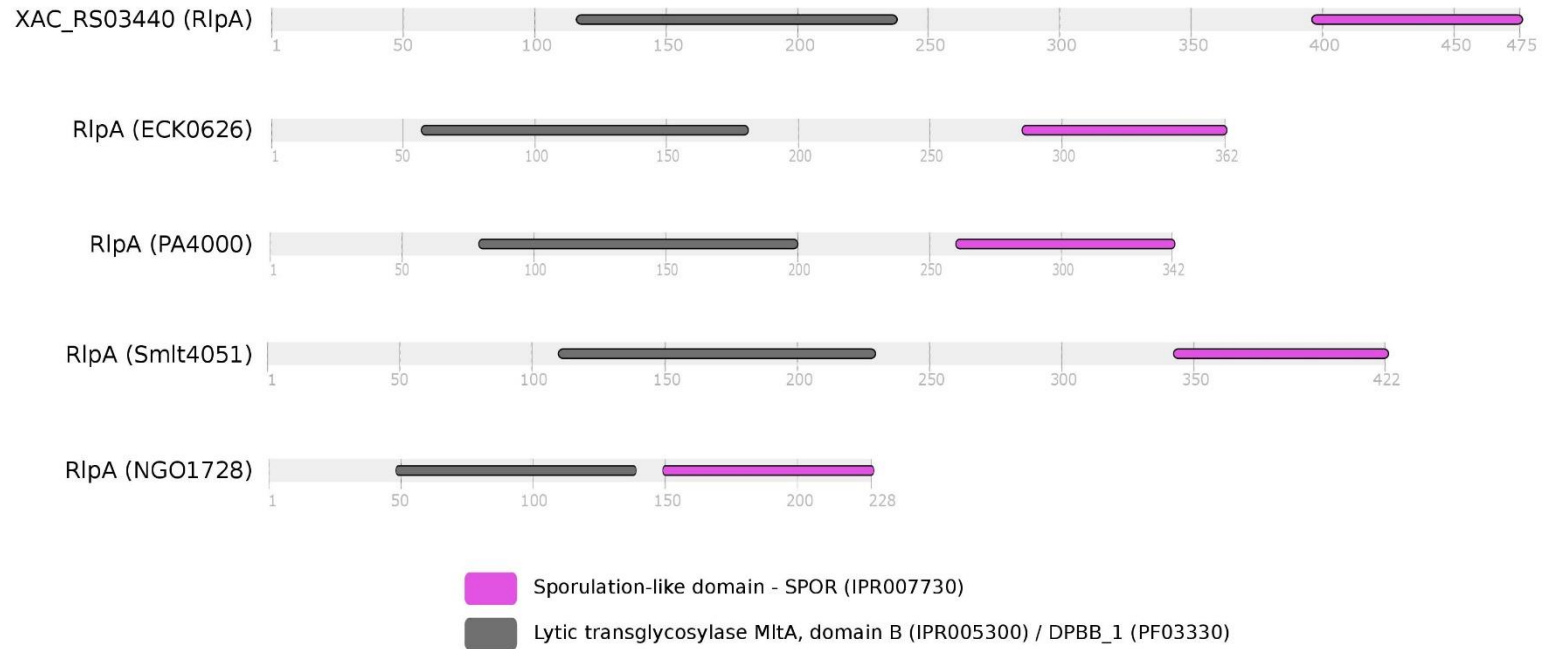
Family 5A - Alignment



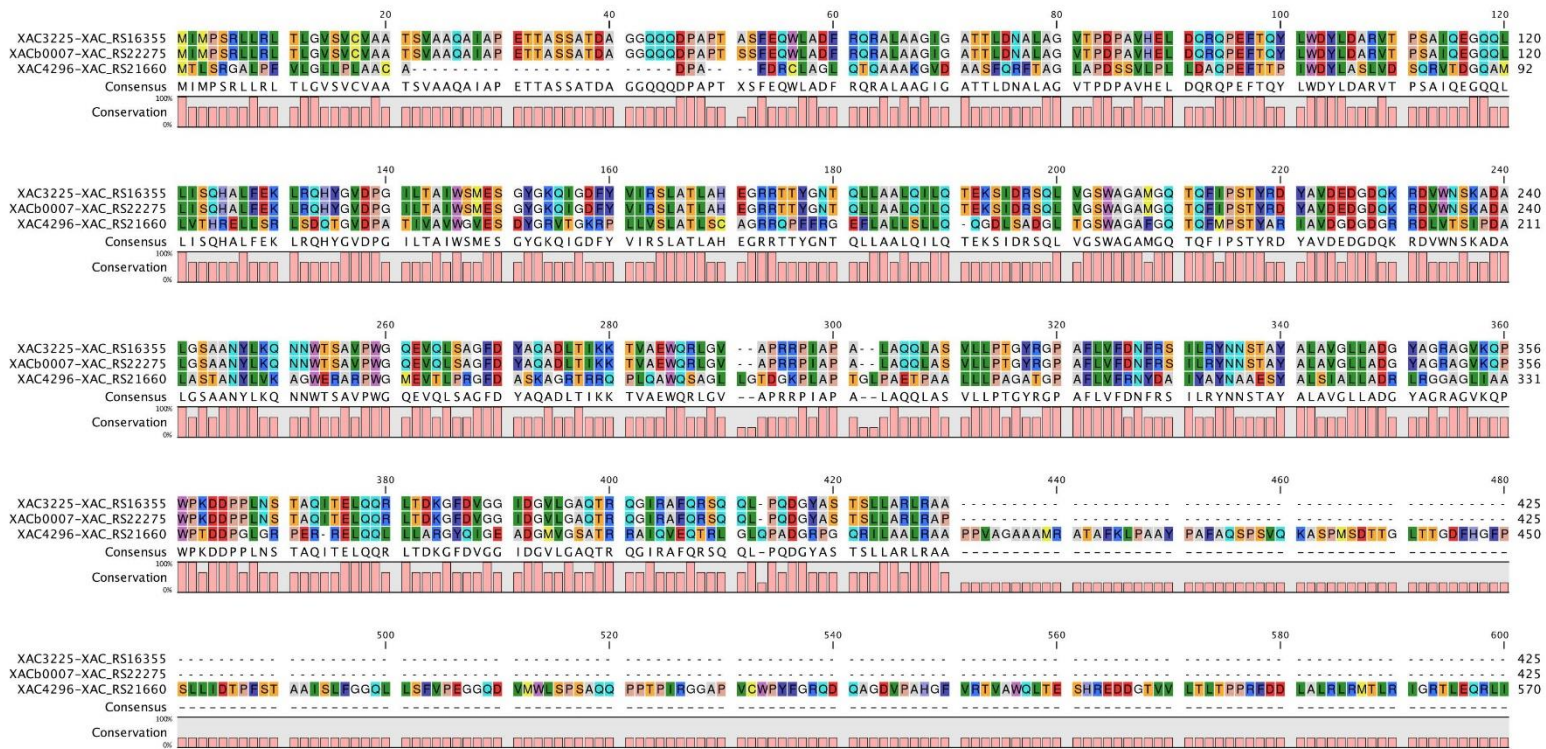
Family 5A - Domain architecture



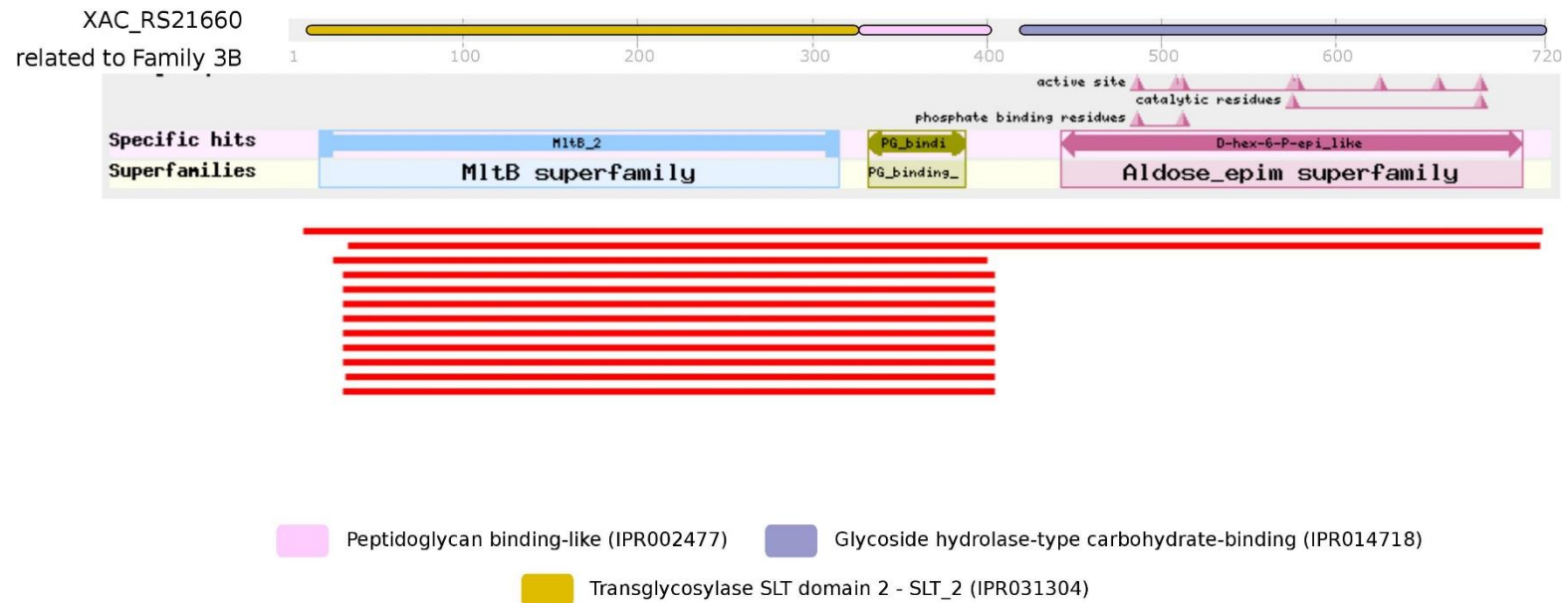
Family 6A - Domain architecture

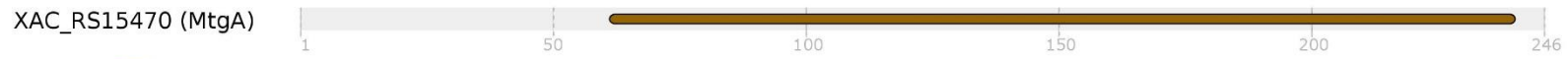


XAC_RS21660 (unknown) - Alignment against Family 3B



XAC_RS21660 - Domain architecture



XAC_RS15470 (MtgA)

UniProt Reviewed - Q8PI51 - Peptidoglycan polymerase that catalyzes glycan chain elongation from lipid-linked precursors.



Biosynthetic peptidoglycan transglycosylase (IPR011812)