

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ORF XAC0239 DE
Xanthomonas citri subsp. *citri*

Catarina Mardegan
Engenheira Agrônoma

2018

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

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ORF XAC0239 DE
Xanthomonas citri subsp. *citri***

Catarina Mardegan

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientadora: Dra. Helen Alves Penha

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

2018

Mardegan, Catarina

M322c Caracterização funcional da ORF XAC0239 de *Xanthomonas citri*
subsp. *citri* / Catarina Mardegan. -- Jaboticabal, 2018
viii, 66 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientadora: Helen Alves Penha

Banca examinadora: José Belasque Junior, Daniel Guariz Pinheiro

Bibliografia

1. Celulose. 2. Fator sigma. 3. Proteína hipotética. 4. Proteína de
membrana. 5. Regulação gênica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.34:631.54

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ORF XAC0238 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

AUTORA: CATARINA MARDEGAN
ORIENTADORA: MARIA INES TIRABOSCHI FERRO
COORIENTADORA: HELEN ALVES PENHA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Pós-doutoranda HELEN ALVES PENHA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JOSÉ BELASQUE JÚNIOR
Departamento de Fitopatologia e Nematologia / ESALQ-USP - Piracicaba/SP

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 25 de maio de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Catarina Mardegan - Nascida em 28 de maio de 1990, natural de Unaí, Minas Gerais, Brasil. Filha de André Guilherme Mardegan e Hilda Aparecida Souza Mardegan. Ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) de Jaboticabal em março de 2010. Durante o curso de graduação fez treinamentos supervisionados e estágios nas áreas de geomática e agricultura de precisão junto ao departamento de Engenharia Agrícola e melhoramento genético de soja, junto ao departamento de Produção Vegetal. No ano de 2014, fez estágio curricular na área de Regulamentação de Biotecnologias na empresa Dow AgroSciences Sementes e Biotecnologia, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Em março de 2016 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), na FCAV/UNESP. Durante o Mestrado desenvolveu projetos e atividades científicas sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Maria Inês Tiraboschi Ferro e coorientação da pós doutoranda Dr^a. Helen Alves Penha, e a supervisão do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro. O trabalho foi realizado no Departamento de Tecnologia desta mesma faculdade e contou com o apoio do Centro de Recursos Biológicos (CREBio), do Laboratório de Genética de Bactérias de Rio Claro e o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com a concessão de bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Maria Inês Tiraboschi Ferro pela oportunidade e confiança em mim depositada;

Ao professor Dr. Jesus Aparecido Ferro, pelos ensinamentos científicos e de vida e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Dr^a. Helen Alves Penha, que além de coorientadora, se tornou uma amiga, pelas sugestões e conselhos dados.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem prontamente o convite, e terem contribuído significativamente com o trabalho.

Em especial, aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular (LBM), Jéssica, Ana, Flávia, Julie, Tamiris, Amanda, Flavinha, Juliana, Michelle, Natasha, Dani, Helô, Fernando, Rafael, Danilo, Luis, Bruno, Wallyngson, pelo excelente convívio, apoio nos experimentos e compreensão nos momentos mais difíceis. Com vocês aprendi muito!

Às amigas do CREBio, Agda e Marisa, que muito me ajudaram na realização do trabalho e pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira e Msc. Lúcia Bonci, ambos do Laboratório de Genética de Bactérias da UNESP, campus de Rio Claro, pelo suporte na realização do ensaio de curva de crescimento *in vitro*.

Às minhas amigas-irmãs jaboticabalenses: Natália, Kristina, Mariana, Gabriela, Talita, Cristal, Fernanda, pelas risadas, compreensão e pela grande família que formamos.

Aos meus familiares, pelo carinho, incentivo e confiança que me fez chegar aonde estou hoje. Especialmente minha mãe (Hilda), pai (André), irmã (Carol) e namorado (Victor), que estão comigo nos melhores e piores momentos. Amo vocês!

À todos que acreditaram, rezaram e permitiram que este momento chegasse.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Citricultura	3
2.2. <i>Xanthomonas citri</i> e o cancro cítrico	4
2.3. Interação planta-patógeno	9
2.4. <i>Domains of Unknown Function</i> (DUFs)	11
2.5. Mutagênese sítio-dirigida por PCR por sobreposição e extensão.....	12
2.6. Fatores de transcrição sigma	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Geral	16
3.2. Específicos.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Seleção e análises <i>in silico</i> da ORF XAC0239.....	17
4.2. Obtenção do DNA da ORF XAC0239	17
4.3. PCR por sobreposição e extensão.....	18
4.4. Clonagem no vetor suicida pNPTS138 e transformação de <i>E. coli</i>	21
4.5. Transformação em células eletrocompetentes de <i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	23
4.6. Teste de patogenicidade	24
4.7. Curva de crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	25
4.8. Curva de crescimento bacteriano <i>in vivo</i>	25
4.9. Ensaio de motilidade <i>swimming</i> e <i>swarming</i>	26
4.10. Ensaio de agregação bacteriana.....	27
4.11. Formação de biofilme bacteriano	27
4.12. Formação de goma xantana	28
4.13. Teste de degradação de celulose	29
4.14. Modelagem molecular	29
4.15. Análises estatísticas.....	30
5. RESULTADOS	31
5.1. Seleção e análises <i>in silico</i> da ORF XAC0239.....	31
5.2. Obtenção do mutante para a ORF XAC0239.....	33
5.3. Teste de Patogenicidade.....	37

	II
5.4. Curvas de crescimento bacteriano.....	40
5.5. Motilidade bacteriana	42
5.6. Agregação bacteriana	43
5.7. Formação de biofilme bacteriano	44
5.8. Formação de goma xantana	45
5.9. Degradação de celulose	46
5.10. Modelagem molecular.....	47
6. DISCUSSÃO	49
8. REFERÊNCIAS.....	57

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ORF XAC0239 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

RESUMO – A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é a bactéria causadora da doença cancro cítrico. A doença atinge todas as variedades comerciais de citros e, o entendimento da relação fitopatogênica permitirá conhecer formas mais eficientes de controle da bactéria. Com o sequenciamento e análise do genoma e transcriptoma da Xac, foram identificadas ORFs que, provavelmente, estão envolvidas em processos de ataque e colonização da bactéria. Para iniciar a caracterização de uma destas ORFs foram utilizadas, neste estudo, as estratégias de mutação sítio-dirigida de PCR por sobreposição e extensão e modelagem molecular. A ORF XAC0239, é predita como proteína de membrana plasmática, e por homologia, possivelmente, pode fazer parte de uma proteína transportadora de zinco, além disso, há indícios de que é regulada por um fator sigma. A mutação teve efeito negativo sobre a ação de celulases e motilidade *swimming* e efeito positivo sobre a formação de biofilme e a multiplicação bacteriana *in vivo*. Aqui é sugerido que na falta desta proteína, houve pouca absorção de zinco, necessário para a formação de biofilme e conseqüentemente, para a patogenicidade. Além disso, sugestiona-se que, como subterfúgio, a bactéria superexpressou genes para produção e/ou ação de celulases, tentando atacar o hospedeiro de forma alternativa.

Palavras-chave: Celulose, fator sigma, proteína hipotética, proteína de membrana, regulação gênica.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF ORF XAC0239 OF *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ABSTRACT - *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) causes the citrus canker disease. The disease reaches all commercial varieties of citrus and, the understanding of the phytopathogenic relationship allow knowing the ways of control of bacteria. With sequencing of the Xac genome and the realization of a transcriptome, ORFs have been identified that are probably involved in bacterial attack and colonization processes. To initiate the characterization of one of these ORFs, in this study, the strategies of site-directed mutagenesis by overlap extension PCR and molecular modeling were used. The ORF XAC0239 is predicted as plasma membrane protein, and by homology may possibly be part of a zinc transporter protein, moreover, there are indications that it is regulated by a sigma factor. The mutation had a negative effect at the cellulases action and swimming motility and a positive effect on biofilm formation and *in vivo* multiplication. Here it is suggested that in the absence of this protein, there was little absorption of zinc, necessary for biofilm formation and consequently for pathogenicity. In addition, it is suggested that, as a subterfuge, the bacteria overexpressed genes for production and / or cellulases action, trying to attack the host on alternative way.

Keywords: Cellulose, sigma factor, hypothetical protein, membrane protein, gene regulation.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Níveis de suscetibilidade de espécies do gênero *Citrus* e relacionadas em relação ao cancro cítrico (MURATA, 2013, adaptado de FEICHTENBERGER et al., 2005; LEITE JUNIOR, 1990; TAZIMA et al., 2008).

Tabela 2. Variedades cítricas contrastantes em relação à suscetibilidade ao cancro cítrico cujo transcriptoma foi analisado por RNA-Seq em condições de infecção por Xac.

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante.

Lista de Figuras

Figura 1. Sintomas de cancro cítrico em frutos (A), folhas (B) e ramos (C). Fontes: Fundecitrus (2018a); Gottwald e Graham (2005).

Figura 2. Ciclo e epidemiologia da doença. Fonte: Adaptado de Gottwald e Graham (2005).

Figura 3. Esquema da estratégia de mutação utilizada. Os oligonucleotídeos B e C possuem caudas complementares, e as regiões AB e CD contêm, aproximadamente, 800 pb para permitir a recombinação homóloga, eliminando a região compreendida entre os oligonucleotídeos B e C, a qual corresponde à ORF a ser estudada. Adaptado de Lee et al. (2004).

Figura 4. Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC0239 (NCBI acesso: AE008923.1) e as regiões flanqueadoras correspondentes a, aproximadamente, 800pb *upstream* e *downstream* à ORF. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas em cinza, amarelo, azul e vermelho, respectivamente, e a região sublinhada corresponde à região nucleotídica da ORF XAC0239.

Figura 5. Mapa do vetor suicida pNPTS138. Fonte: Cappelletti (2010).

Figura 6. Perfil transcricional relativo (*fold-change*) da ORF XAC0239 em oito genótipos de citros e relativos contrastantes em relação à suscetibilidade ao cancro cítrico em 48 (verde) e 72 (vermelho) horas após a inoculação com Xac.

Figura 7. Resultados da busca *in silico* nas bases de dados (A) CDD (NCBI) e (B) SignalP 4.0.

Figura 8. Sequência nucleotídica da ORF XAC0239 (em negrito) e 50 nucleotídeos a montante. As sequências sublinhadas representam a região promotora, as sequências coloridas, as tricas dos códon de iniciação (verde) e de terminação (vermelho).

Figura 9. Localização dos sítios de anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*) A, B, C e D e suas respectivas orientações em relação ao genoma da Xac. A região em rosa representa a ORF XAC0239. Mapa desenhado a partir do *software* 'SnapGene® Viewer' versão 4.1.2.

Figura 10. Diagrama esquemático do processo de deleção da ORF XAC0239, mostrando a região de deleção com os respectivos fragmentos de DNA AB e CD que, quando unidos, formam o fragmento AD.

Figura 11. Eletroforese em gel demonstrando os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados via PCR: AD (1685pb), AB (787pb), CD (767pb) e ADΔ (1554pb). M - padrão de peso molecular "O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder" (Thermo Fisher). Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (10mg.mL⁻¹).

Figura 12. Alinhamento pela ferramenta BLASTn. (A) Esquema da sequência da Xac Δ 0239 em relação à sequência genômica da Xac 306. (B) Comparação nucleotídica do fragmento AB. (C) Comparação nucleotídica do fragmento CD.

Figura 13. Fotodocumentação do teste de patogenicidade na variedade lima ácida 'Galego' em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. Sintomas observados aos 2, 5, 8, 11, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI) das linhagens Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante). Estão representadas as superfícies adaxial (quadro superior) e abaxial (quadro inferior) das folhas.

Figura 14. Fotodocumentação do teste de patogenicidade na variedade laranja doce 'Pera Rio' em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. Sintomas observados aos 2, 5, 8, 11, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI) das linhagens Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante). Estão representadas as superfícies adaxial (quadro superior) e abaxial (quadro inferior) das folhas.

Figura 15. Curva de crescimento bacteriano *in vitro*, contrastando-se o crescimento da Xac WT (selvagem) e da Xac Δ 0239 (mutante). Os valores representam as médias das densidades ópticas por tempo de avaliação (horas). As barras representam os erros padrão.

Figura 16. Curva de crescimento bacteriano *in vivo* na variedade laranja doce 'Pera Rio', contrastando-se o crescimento da Xac WT (selvagem) e da Xac Δ 0239 (mutante). Os valores representam as médias das UFC/mL/cm² por tempo (dias após a inoculação). As barras representam os erros padrão ($p \leq 0,5$).

Figura 17. Análise da motilidade *swimming* e *swarming* da Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante), demonstrando as áreas (cm²) de deslocamento das colônias (A). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), e as barras, o erro padrão das médias. Deslocamento das colônias formadas nos testes de motilidade (B).

Figura 18. Ensaio de agregação bacteriana comparando-se a Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). (A) Gráfico com as médias das aferições de densidade óptica (600nm) por tempo de avaliação. (B) registro fotográfico comparando-se as suspensões bacterianas. As barras representam o erro padrão das médias.

Figura 19. Ensaio de formação de biofilme em meio NB e XVM2 suplementado com glicose a 1%, comparando-se a Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). Os dados representam as médias dos valores de densidade óptica (595nm). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) e as barras, o erro padrão das médias.

Figura 20. Formação de goma xantana pela Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). Os valores representam as médias de quantidade de goma (mg) produzida por bactéria (mg). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) e as barras, o erro padrão das médias.

Figura 21. Degradação de celulose pela Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante) avaliadas por meio da ação de CMCase (atividade de carboximetilcelulose). (A) valores médios das áreas degradadas pela celulase ao redor das colônias e, (B) colônias formadas em meio de cultura com CMC após a coloração com corante Vermelho Congo (1%). H: diâmetro do halo; C: diâmetro da colônia. Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), e as barras, o erro padrão das médias.

Figura 22. Resultados da modelagem molecular da proteína XAC0239 pela ferramenta PHYRE2. (A) Predição de estrutura secundária; (B) Modelo proteico final; (C) Visualização da topologia predita.

Figura 23. Resultado da modelagem molecular pela ferramenta I-TASSER. (A) Predição da estrutura secundária. (B) Modelo proteico final.

Figura 24. Modelo simples proposto para identificação da provável função da ORF XAC0239. A ausência do produto proteico dessa ORF acarretou na redução da formação do biofilme bacteriano, o qual está diretamente relacionado com a capacidade de multiplicação celular e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da doença. Ainda, de maneira compensatória, a bactéria pode estar superexpressando genes relacionados à motilidade tipo *swimming* e degradação de parede celular.

1. INTRODUÇÃO

O cancro cítrico está entre as mais preocupantes doenças na produção citrícola, e é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (FERENCE et al., 2017; JALAN et al., 2014). Em decorrência do aumento desta doença abordagens e ferramentas biotecnológicas têm sido desenvolvidas com o intuito de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade e virulência. Com isso, é permitido o desenvolvimento de estratégias mais efetivas para o combate desse fitopatógeno.

Nesse contexto, muitas pesquisas têm sido feitas para elucidar os mecanismos de interação planta-patógeno, entre elas o sequenciamento do genoma da *X. citri* subsp. *citri* 306 realizado por da Silva e colaboradores (2002), o qual abriu portas para muitos estudos. Neste trabalho, foi revelada a presença de um cromossomo circular com 5.175.554 pares de bases (pb), e dois plasmídeos: pXac33 (33.699 pb) e pXac64 (64.920 pb). A anotação do referido genoma, pelo banco de dados UniProt, revelou 4.355 genes que codificam proteínas, entre eles, 1.603 (37,16%) não apresentam função predita, ou seja, são quadros abertos de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs) que codificam proteínas hipotéticas (*Taxon identifier*: 190486, acesso em 30/05/2018) (UNIPROT CONSORTIUM, 2018).

Com base nas informações contidas no genoma da Xac e no banco de dados (XanthostKB - HERAI, *dados não publicados*), o qual apresenta o perfil transcricional de genes deste organismo, foi selecionada para estudos funcionais a ORF XAC0239. Com alta expressão gênica em todas as variedades cítricas analisadas, esta ORF possui 52 aminoácidos, é caracterizada como hipotética, pertencente à família DUF (*Domain of Unknown Function*) 1328 e é classificada como componente celular de membrana plasmática, de acordo com a ferramenta InterProScan (FINN et al., 2016).

Quando se trata da interação patógeno-hospedeiro, há ainda muita informação a ser desvendada e uma forma de aumentar os conhecimentos sobre genes alvo nesse processo é através do estudo de proteínas hipotéticas. Pesquisas sobre domínios proteicos e famílias permitem sugerir uma função específica, entretanto essas predições são, geralmente, feitas *in silico*, devido à grande quantidade de informações contidas em bancos de dados. Para complementá-las, são necessárias evidências experimentais que comprovem suas funções (BASHIR et al., 2017), bem como seu papel na patogenicidade.

Devido ao déficit de pesquisas sobre a ORF XAC0239 da *X. citri* subsp. *citri*, o presente trabalho visou avaliá-la, permitindo inferir o papel deste gene no processo de infecção bacteriana. Dentre as abordagens utilizadas para esta finalidade, a mutação pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por sobreposição e extensão seguida de recombinação homóloga (LEE et al., 2004) foi a escolhida por se tratar de uma estratégia eficiente em estudos sobre função gênica, uma vez que torna exequível a deleção da ORF que codifica a proteína.

Uma vez obtido o mutante de Xac para a ORF XAC0239, foram feitos experimentos *in vivo* e *in vitro*, de modo a tentar classificá-la e/ou inferir o seu papel no desenvolvimento da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citricultura

Com origem principal na Ásia, as plantas cítricas foram introduzidas no Brasil, provavelmente pelo estado da Bahia, por volta de 1540. Assim, a citricultura se tornou um dos mais importantes setores do agronegócio brasileiro. O Brasil, maior produtor mundial de laranja *in natura*, perdendo apenas para a China na produção de outras frutas cítricas, é também o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja concentrado (NEVES et al., 2010).

A produção mundial de laranja fresca na safra 2016/2017 foi de 53,26 milhões de toneladas, com o Brasil sendo o responsável por 38,29% desta produção (USDA, 2018). A recente estimativa publicada pelo Fundecitrus, identificou que com a expectativa de um ano mais seco e temperaturas acima do padrão, há previsão de queda de 17% na produção brasileira para a safra 2018/2019, sendo produzidas 288,29 milhões de caixas de laranja (FUNDECITRUS, 2018b).

O estado de São Paulo é responsável por 77,6% da produção brasileira de laranja (IBGE, 2018) e a importância desta cultura fica ainda mais evidente quando levados em conta os benefícios em relação ao consumo das frutas, seja em relação ao elevado valor nutricional, fundamental para a nutrição da população, ou ainda pela geração de renda e empregos nas diversas áreas produtoras. No Brasil, até 2010, eram estimados cerca de 230 mil empregos direta ou indiretamente gerados pela citricultura no Brasil, sendo a maioria localizados no estado de São Paulo (NEVES et al., 2010).

Além dos benefícios em relação à produção e consumo do fruto *in natura*, ainda há a possibilidade de consumo da fruta processada, o que gera maior agregação de valor para o produto. Durante a Segunda Guerra Mundial, no início da década de 1940, houve uma proibição da exportação da fruta *in natura*, e a alternativa foi a comercialização da fruta por meio do suco de laranja (NEVES; JANK, 2006). Desta forma, através da agregação de valor da laranja, surgiram novas oportunidades para empresas processadoras e exportadoras do suco e, conseqüentemente, para produtores e municípios. Além disso, possibilitou o

desenvolvimento do setor de pesquisas científicas com avanços tecnológicos e do mercado de trabalho.

Conhecidos genericamente como “citros”, os grupos de plantas compreendidos pela citricultura abrange espécies do gênero *Citrus* e afins (*Fortunella* e *Poncirus*) e ainda híbridos da família Rutaceae, representados, na sua maioria por laranjas (*Citrus sinensis*), tangerinas (*C. reticulata* e *C. deliciosa*), limões (*C. limon*), limas ácidas como o Tahiti (*C. latifolia*) e o Galego (*C. aurantiifolia*), e doces como a lima da Pérsia (*C. limettioides*), pomelo (*C. paradisi*), cidra (*C. medica*), laranja azeda (*C. aurantium*) e toranjas (*C. grandis*) (MATTOS JUNIOR et al., 2005).

Em virtude da extensa área plantada e amplo quadro varietal, a citricultura sofre fortemente o efeito de fatores bióticos e abióticos. Além de afetar a produção e exportação em termos econômicos, são afetados ainda social e ambientalmente, devido à obrigatoriedade da migração das regiões produtoras e a intervenção com prevenção e controle desses fatores, como será detalhado no item “2.2. *Xanthomonas citri* e o cancro cítrico” (SANCHES, 2014).

Entre os fatores bióticos que acometem a citricultura há diversas doenças, sendo as principais: Pinta Preta, Clorose Variegada dos Citros (CVC), Leprose, Gomose, *Huanglongbing* (HLB) ou *Greening*, Tristeza dos citros e Cancro cítrico. De acordo com Neves e colaboradores (2010), em uma década, 40 milhões de árvores foram erradicadas devido a pragas e doenças, com perdas estimadas em quase 80 milhões de caixas por ano. Dentre as doenças citadas, o cancro cítrico está entre as mais preocupantes, e é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (BRUNINGS; GABRIEL, 2003, FEICHTENBERGER et al., 2005; FUNDECITRUS, 2018a).

2.2. *Xanthomonas citri* e o cancro cítrico

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (classificada na ocasião do sequenciamento do seu genoma como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* - Xac), apresenta a seguinte classificação taxonômica: Bactéria, proteobacteria, gammaproteobacteria, Xanthomonadales, Xanthomonadaceae, *Xanthomonas*. Possui propriedades microbiológicas como bactéria Gram-negativa, aeróbica restrita, bastonetiforme e monotríquia (móvel por um único flagelo polar). Em

meio de cultura, a bactéria forma colônias amareladas devido à produção do pigmento xantomonadina (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; FERENGE et al., 2017).

Por afetar todas as variedades comerciais cítricas e estar disseminada por todo o mundo o cancro cítrico é considerado uma importante doença que acomete a citricultura. Bactérias do gênero *Xanthomonas* podem ainda causar cancrozes que apresentam os mesmos sintomas que o cancro cítrico. A cancrose B ou falsa cancrose, provocada pela bactéria *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* estirpe B (XauB), é menos agressiva devido à capacidade de afetar apenas variedades de limões e limas, e sendo restrita a países da América do Sul. E a cancrose C, também conhecida como cancrose da lima ácida 'Galego', por infectar esta espécie, além de Citrumelo 'Swingle', tem como agente causal a bactéria *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* estirpe C (XauC) e está limitada apenas ao Brasil. (BITANCOURT, 1957; CIVEROLO, 1984; FERENGE et al., 2017; JACIANI et al., 2009; JALAN et al., 2014).

Os sintomas do cancro cítrico aparecem em frutos, ramos e em ambos os lados das folhas. Estes são facilmente detectados por desenvolverem lesões necróticas circulares de coloração marrom, com aspecto de encharcamento e halo clorótico. Ainda, as lesões progridem para ferimentos ásperos, com células hiperplásicas, sintoma característico do cancro (Figura 1) (BEHLAU, 2014; BRUNINGS; GABRIEL, 2003; FERENGE et al., 2017). Em um estágio mais avançado causa intensa desfolha e queda dos frutos, devido ao desequilíbrio hormonal causado pela alta produção de etileno, inviabilizando economicamente a produção.

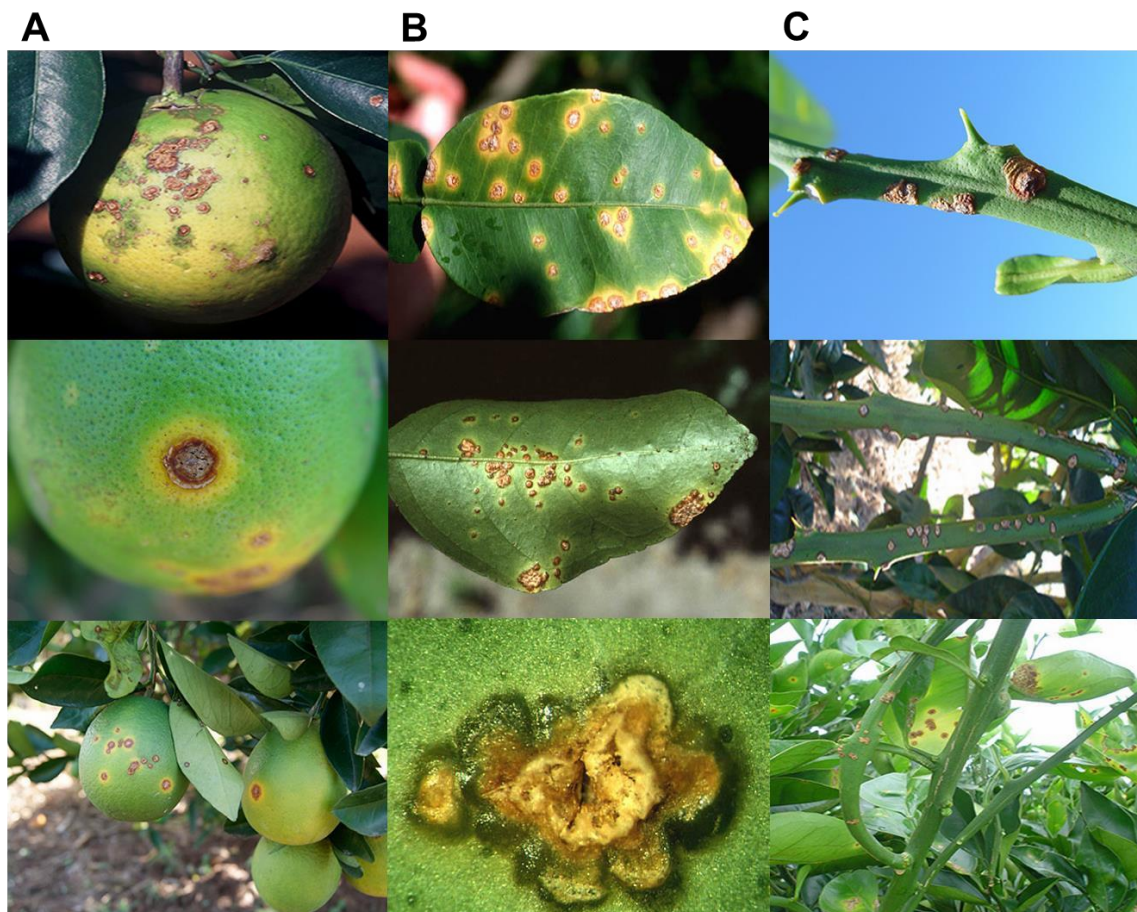


Figura 1. Sintomas de cancro cítrico em frutos (A), folhas (B) e ramos (C).
Fontes: Fundecitrus (2018a); Gottwald e Graham (2005).

A propagação do agente etiológico ocorre através de material vegetal infectado, ferramentas e máquinas contaminadas com o inóculo bacteriano e, principalmente, por meio de chuvas com ventos. A penetração se dá por meio de aberturas naturais, como os estômatos, ou ferimentos produzidos por espinhos, insetos, como a larva minadora (*Phyllocnistis citrella*), e ainda a poda (Figura 2) (FUNDECITRUS, 2018a; SCHUBERT; SUN, 2003).

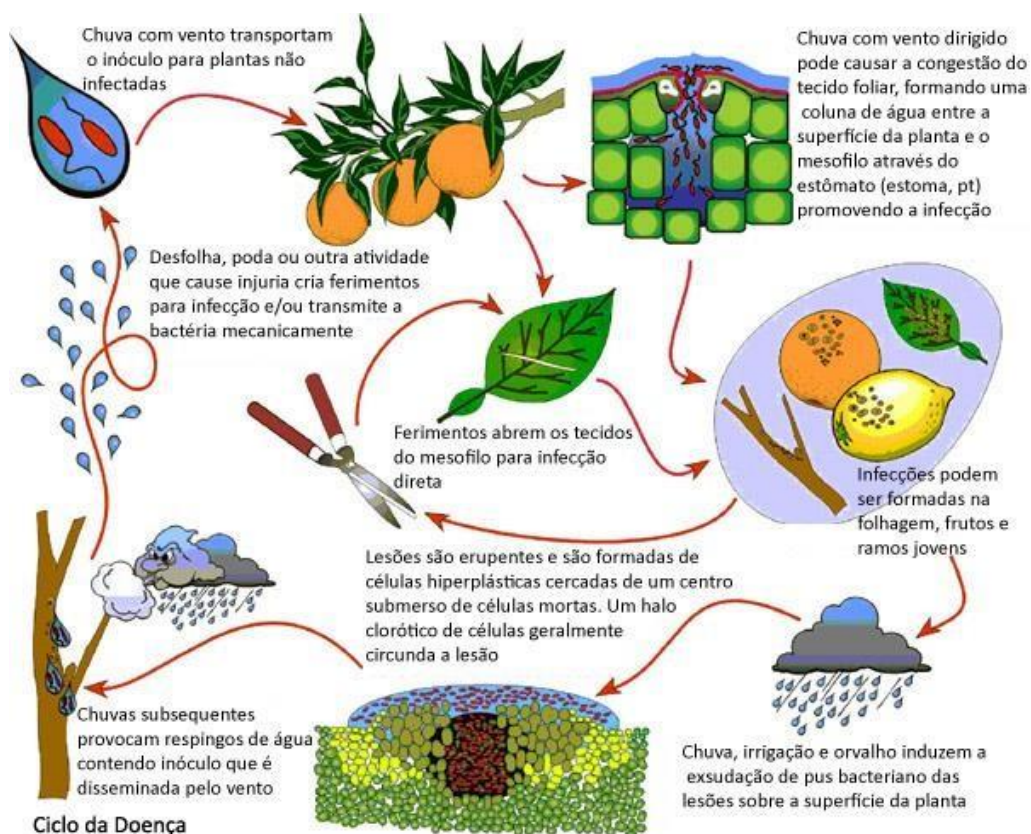


Figura 2. Ciclo e epidemiologia da doença. Fonte: Adaptado de Gottwald e Graham (2005).

Embora a incidência média dos últimos quatro anos seja a mais baixa entre as principais doenças que atacam variedades comerciais de citros, a doença apresenta ampla disseminação no parque citrícola, sendo o HLB (*greening*) e o cancro cítrico as que mais preocupam a cadeia produtiva deste agronegócio (FUNDECITRUS, 2018a).

Conseqüentemente, após o aparecimento da doença na região de Presidente Prudente, São Paulo, no ano de 1957 (BITANCOURT, 1957), intensos programas de erradicação e controle foram estabelecidos, principalmente entre as décadas de 1960 e 1990 (BEHLAU; BELASQUE JR, 2014).

De acordo com levantamento realizado no ano de 2017, pelo Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), o cancro cítrico está presente em 12,92% dos talhões no cinturão citrícola brasileiro, confirmando grande preocupação com a doença. Ainda, são verificadas que 8,68% das árvores apresentam incidência de cancro, sendo que destas, 37,35% estão na região noroeste do estado de São Paulo (FUNDECITRUS, 2018a).

Para o controle do patógeno, atualmente vigora a Instrução Normativa nº 21 publicada no Diário Oficial da União em 11 de maio de 2018, a qual estabelece quatro *status* fitossanitários relativos ao cancro cítrico: área sem ocorrência da praga, área livre da praga, área sob mitigação de risco (SMR) e área sob erradicação e as medidas adotadas nessa Instrução estão relacionadas, principalmente, ao processamento/beneficiamento de frutos sintomáticos (BRASIL, 2018).

Contudo, a erradicação das árvores contaminadas não garante a eliminação total da bactéria. Outros métodos de controle devem ser utilizados, como utilização de mudas provenientes de viveiros instalados em áreas livres de cancro cítrico, emprego de “quebra ventos” nas áreas de produção, pulverizações com cobre e controle da larva minadora dos citros, mas são todos métodos preventivos e não curativos (FUNDECITRUS, 2018a).

O cancro cítrico afeta todas as variedades de citros comerciais. No entanto, há variáveis níveis de suscetibilidade entre estes genótipos (Tabela 1) (AMARAL et al., 2010; GOTTWALD; PIERCE; GRAHAM, 2002).

Tabela 1. Níveis de suscetibilidade de espécies do gênero *Citrus* e relacionadas em relação ao cancro cítrico (MURATA, 2013, adaptado de FEICHTENBERGER et al., 2005; LEITE JUNIOR, 1990; TAZIMA et al., 2008).

Níveis de suscetibilidade	Genótipos	Espécies
Resistente	“Calamondin”	<i>Citrus madurensis</i>
	“Kumquat”	<i>Fortunella</i> spp.
Pouco resistente	Tangerina “Ponkan”	<i>C. reticulata</i>
	Tangerina “Satsuma”	<i>C. unshiu</i>
	Tangerina “Sunki”	<i>C. sunki</i>
	Tangerina “Cleopatra”	<i>C. reshni</i>
Moderadamente resistente	Tangerina “Darcy”	<i>C. reticulata</i>
	Tangerina “Cravo”	<i>C. reticulata</i>
	Laranja doce “Folha Murcha”	<i>C. sinensis</i>
	Laranja doce “Valência”	<i>C. sinensis</i>
Suscetível	Laranja doce “Pera Rio”	<i>C. sinensis</i>
	Laranja doce “Hamlin”	<i>C. sinensis</i>
	Laranja doce “Bahia”	<i>C. sinensis</i>
	Laranja doce “Seleta Vermelha”	<i>C. sinensis</i>
	Tangerina “Clementina”	<i>C. clementina</i>
Altamente suscetível	Lima ácida “Tahiti”	<i>C. latifolia</i>
	Pomelos	<i>C. paradisi</i>
	Lima ácida “Galego”	<i>C. aurantiifolia</i>
	Limão “Siciliano”	<i>C. limon</i>

Em decorrência da constante preocupação com a incidência de cancro cítrico nas áreas produtoras e dos fatores que dificultam os processos de realização do melhoramento convencional de citros como tempo, custo e demanda de extensas áreas, são realizados contínuos esforços para evitar a propagação da doença em regiões não endêmicas (OLIVEIRA et al., 2014; SCHUBERT; SUN, 2003). Dentre estes esforços, a elucidação dos fatores que compõem a doença bem como do arsenal molecular utilizado pela bactéria durante a infecção, possibilita o desenvolvimento de abordagens de combate ou, ao menos, convivência com a doença.

2.3. Interação planta-patógeno

A interação entre o patógeno e o hospedeiro pode ser encarada como uma luta pela sobrevivência entre organismos, na qual ambos lançam mão de suas armas bioquímicas e fisiológicas para atacarem e, ao mesmo tempo, se defenderem em uma relação dinâmica com o meio ambiente.

A habilidade das plantas em atrasar ou evitar a entrada do hospedeiro em seus tecidos é devido a uma forma de imunidade chamada resistência não hospedeira. Esta é uma forma de defesa, que pode ser fisiológica, com a formação de camadas de cutículas, barreiras físicas e fechamento de estômatos, ou bioquímica, com a indução de reações de defesa após o reconhecimento do patógeno na superfície da célula (RANI, 2015). Em suma, a resistência não hospedeira é aquela em que a planta não é afetada diretamente pelo patógeno. Assim sendo, o que nos interessa, neste estudo, é a interação hospedeira.

Na interação hospedeira os recursos ativados pelos organismos irão estimular a doença dependendo do tipo de relação que ocorre entre eles. As interações entre a planta e seus patógenos envolvem duas diferentes formas de expressão. A planta deve ser capaz de reconhecer e se defender contra um agente patogênico que entra em contato com a sua superfície, bem como o patógeno deve empregar artifícios para manipular a biologia da planta e criar um ambiente adequado para seu desenvolvimento e multiplicação (MARTINELLI et al., 2012). Esta interação depende da combinação de fatores como estágios de desenvolvimento da planta e condições climáticas no momento da infecção

(RANI, 2015) e para ocorrer esta comunicação, tanto as plantas como os fitopatógenos sofreram processos evolutivos em conjuntos de genes (BOYD et al., 2013).

Nesse sentido, há um constante progresso para o entendimento das respostas moleculares do hospedeiro ao ataque do patógeno, assim como o conhecimento do arsenal que o patógeno utiliza no processo infeccioso.

Com o sequenciamento do genoma de diversas fitobactérias, entre elas *Xanthomonas*: *X. campestris* pv. *vesicatoria* (THIEME et al., 2005), *X. oryzae* subsp. *oryzae* (LEE et al., 2005), *X. campestris* pv. *campestris* (DA SILVA, et al., 2002; QIAN et al., 2005), *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* B e C (MOREIRA et al., 2010) e *X. citri* subsp. *citri* (*Xac*) linhagem 306 (DA SILVA et al., 2002), tornou-se possível a descrição dos genes presentes nestes genomas, e a caracterização estrutural, identificação e anotação dos mesmos.

A disponibilidade da sequência completa do genoma da *Xac*, assim como o de plantas cítricas hospedeiras (XU et al., 2013; WU et al., 2014), têm acelerado as descobertas dos mecanismos moleculares de interação entre eles, possibilitando o entendimento dos artifícios de resistência usados pelas plantas hospedeiras, bem como os de virulência do patógeno para, futuramente, adotar estratégias inovadoras capazes de controlar o cancro cítrico e outras doenças bacterianas (JALAN et al., 2014).

A transcriptômica é uma área da ciência de extrema importância para o entendimento das interações entre plantas e patógenos. Analisando o transcriptoma de diferentes células ou tecidos, é possível entender mais profundamente a constituição da célula, as quantidades de genes expressos e quando estes ligam-se ou desligam-se nas diversas condições fisiológicas e alterações ocorridas devido às doenças (ADAMS, 2008).

Em 2013, Jalan e colaboradores desenvolveram o primeiro transcriptoma de cepas de *Xac* utilizando a metodologia de RNA-seq e identificaram, nas análises dos dados, numerosos genes diferencialmente expressos que codificam componentes do sistema de secreção tipo III oferecendo assim, suporte para caracterização de alguns mecanismos de virulência desta bactéria. A partir daí vários outros estudos foram feitos com o mesmo propósito, estabelecer genes e vias metabólicas envolvidos com a patogenicidade de *Xanthomonas*, entre elas *X. axonopodis* subsp. *glycines* (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG;

LINDOW, 2016); *X. citri* subsp. *citri* (JIA et al., 2017; KOGENARU et al., 2012), e ainda comparando a Xac 306 com espécies relacionadas (JALAN et al., 2014).

Nos anos de 2013 e 2014, oito espécies cítricas contrastantes em relação à suscetibilidade ao cancro cítrico tiveram os dados de expressão gênica temporal e diferencial analisados durante o processo de infecção (CAVALLINI, 2013; COFRE, 2013; MURATA, 2013; PERON, 2014), juntamente com os dados de expressão gênica temporal da Xac (MURATA, 2013) (Tabela 2). Estes dados foram gerados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) da UNESP campus de Jaboticabal, aumentando a gama de informações para elucidar os mecanismos de virulência da bactéria.

Tabela 2. Variedades cítricas contrastantes em relação à suscetibilidade ao cancro cítrico cujo transcriptoma foi analisado por RNA-Seq em condições de infecção por Xac.

RESISTENTES	SUSCETIVEIS	AUTOR
Laranja 'Pera Rio'	Lima ácida 'Galego'	CAVALLINI, 2013
'Kumquat'	Laranja doce 'Valência'	COFRE, 2013
Tangerina 'Satsuma'	Laranja doce 'Hamlin'	MURATA, 2013
Tangerina 'Ponkan'	Laranja doce 'Bahia'	PERON, 2014

Após análises dos dados gerados, os mesmos foram organizados em dois bancos de dados, tanto para Xac – XanthostKB (*Knowledge Base for Transcriptome of Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 *Interactome*) (HERAI, dados não publicados), como para as variedades de citros – CitrusKB (*Knowledge Base for Transcriptome of Citrus Interactome*) (FERRASA, dados não publicados).

De posse das informações sobre as proteínas hipotéticas no genoma de Xac e, juntamente com a análise da expressão gênica destas proteínas através dos transcriptomas de Xac em condições infectantes, desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, é possível afirmar que há proteínas dessa bactéria sem categorização e/ou anotação que estejam envolvidas nos processos de colonização da célula hospedeira e de patogenicidade ou virulência.

2.4. Domains of Unknown Function (DUFs)

Domínios proteicos são fragmentos de sequências conservados evolutivamente que contribuem, geralmente, para a função, estrutura ou interação proteica e conseqüentemente para o papel desta (MARCHLER-

BAUER, 2017). A presença de domínios proteicos sugere uma possível função da proteína, sendo considerado o passo inicial no processo de anotação e classificação proteica. No entanto, estes domínios são inferidos por predições e homologias, enfatizando a necessidade de experimentos que comprovem a atividade da proteína investigada, bem como, no caso deste trabalho, o papel na patogenicidade da Xac (MARCHLER-BAUER, 2017).

Quando proteínas têm suas funções experimentalmente determinadas, são agrupadas em famílias dentro da base de dados Pfam. Já na ausência de informação funcional, as proteínas são agrupadas em famílias de acordo com as sequências conservadas compartilhadas entre elas (FINN et al., 2017). Estas famílias, nas quais são agrupadas as proteínas sem informação, constituem um grande grupo chamado DUFs (*Domains of Unknown Function*) (BATEMAN, 2010).

Os DUFs são criados com a mesma atenção que as demais famílias do Pfam, a única diferença é que os curadores são incapazes de identificar através da literatura científica informações funcionais consistentes para classificá-los (BATEMAN, 2010). No ano de 2013, Goodacre, Gerloff e Uetz constataram que aproximadamente 2.700 DUFs são encontrados nos genomas bacterianos, enquanto que 1.500 em eucariotos. Os mesmos autores sugerem que haja pesquisas experimentais que foquem em DUFs conservados e essenciais para análise funcional, dada a importante e ampla distribuição taxonômica dessa categoria (GOODACRE; GERLOFF; UETZ, 2013) e, entre essas, uma estratégia eficiente é a mutagênese, descrita no tópico subsequente.

2.5. Mutagênese sítio-dirigida por PCR por sobreposição e extensão

Mutações genéticas são amplamente utilizadas para estabelecer funções proteicas, inclusive de proteínas hipotéticas e identificar genes importantes para a compreensão dos patossistemas bacterianos, entre eles Xac-citros (CHEN et al., 2010; LAIA et al., 2009; YAN; WANG, 2011, YAN; WANG, 2012). Estudos com mutações sítio-dirigidas acompanhadas de recombinação homóloga demonstram essa importância como, por exemplo, em *Phanerochaete chrysosporium* para investigação da associação de aminoácidos com os substratos na célula (JING; FENG, 2015), em *X. vesicatoria* para estudar genes

que regulam a captação de ferro pelas plantas (LIU et al., 2016), em *Arabidopsis thaliana* para descrever um método que gera mutações herdáveis (HYUN et al., 2015) e, ainda, com *X. citri* subsp. *citri*, em que foram observadas diminuições na virulência, multiplicação da bactéria e produção de biofilme em ensaios envolvendo mutantes obtidos por esta técnica (LAIA et al., 2009; YAN; WANG, 2012).

As técnicas de mutação sítio-dirigida são largamente utilizadas para fazer alterações gênicas como inserção ou deleção de bases. Dentre as abordagens de mutagênese sítio-dirigida, a mutação pela técnica de PCR por sobreposição e extensão (*Overlap Extension PCR Mutagenesis*) tem sido estabelecida como um método padrão, seja ela substituição, inserção ou deleção, como descrito por Lee e colaboradores (2004). Em seguida, a recombinação homóloga é realizada por meio de vetores plasmidiais que carregam o fragmento mutado, para serem permutados reciprocamente com o gene presente no genoma bacteriano que compartilha uma sequência praticamente idêntica (NELSON; COX, 2014).

Esta técnica apresenta-se como uma eficiente alternativa para a determinação da função de um gene cuja função é desconhecida, como a ORF do presente estudo, uma vez que torna exequível a deleção do gene que codifica a proteína hipotética.

No caso da Xac, uma vez obtido o mutante, é possível a análise de multiplicação e virulência do mesmo através dos testes de patogenicidade e crescimento *in vivo*. Para inferir o efeito da deleção do gene, demais avaliações fenotípicas oferecem um suporte complementar ao resultado, devido à importância dos processos bioquímicos e fisiológicos na sobrevivência e desenvolvimento do patógeno, além da relação direta nos processos de patogenicidade e virulência da bactéria.

Para a deleção de um fragmento de DNA ou de uma ORF, como no presente estudo, pela técnica de mutagênese sítio-dirigida de PCR por sobreposição e extensão (LEE et al., 2004) são empregadas reações de PCRs. No primeiro passo são realizadas duas PCRs primárias, independentes, para gerar fragmentos de DNA flanqueadores à ORF, esses fragmentos são denominados de AB e CD. No segundo, é realizada uma reação de PCR, em que são usados como DNA molde os fragmentos AB e CD anteriormente citados.

Durante os ciclos de extensões da reação de PCR secundária, caudas complementares adicionadas aos oligonucleotídeos B e C se ligam, visando unir os fragmentos flanqueadores, construindo um único fragmento onde há a deleção da sequência da ORF a ser estudada. As regiões flanqueadoras à ORF permitem que, posteriormente, possa ser realizada a recombinação deste fragmento com a região homóloga do genoma, eliminando assim a região compreendida entre os oligonucleotídeos B e C do genoma da *Xac*. Uma representação esquemática da deleção da ORF está apresentada na Figura 3.

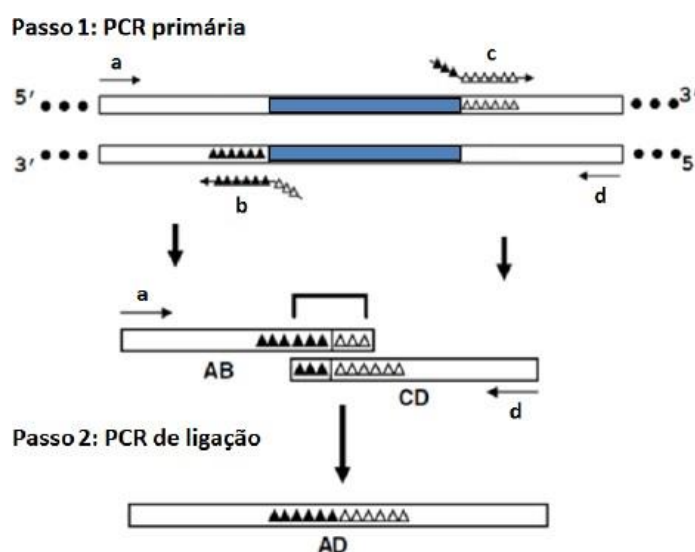


Figura 3. Esquema da estratégia de mutação utilizada. Os oligonucleotídeos B e C possuem caudas complementares, e as regiões AB e CD contém, aproximadamente, 800 pb para permitir a recombinação homóloga, eliminando a região compreendida entre os oligonucleotídeos B e C, a qual corresponde à ORF a ser estudada. Adaptado de Lee et al. (2004).

2.6. Fatores de transcrição sigma

Fatores sigma pertencem a uma classe de proteínas que se ligam à subunidades da RNA polimerase de procaríotos. São responsáveis pelo redirecionamento da transcrição, gerando alterações nas expressões gênicas e atividades proteicas em resposta a estímulos ambientais (BORUKHOV; NUDLER, 2003; DONG; SCHELLHORN, 2010).

Os efeitos dos fatores sigma na virulência dos patógenos são variáveis, diferindo em cada espécie. Em *Salmonella enterica* e *Vibrio cholerae*, por exemplo, o fator requerido é o RpoS (DONG; SCHELLHORN, 2010), já em

espécies de *Xanthomonas* o fator sigma identificado é o RpoN, σ^N ou σ^{54} (GICHARU et al., 2016; LEE; WENG; TSENG, 2003; TIAN et al., 2015).

Os fatores sigma, simultaneamente, regulam um grande número de genes de procaríotos. Muitos estudos correlacionam esses fatores, com os mais diversos mecanismos de ação dos microrganismos contra seus hospedeiros, incluindo regulação de metabólitos secundários e proteínas extracelulares de *Erwinia carotovora* (MUKHERJEE et al., 1998), genes flagelares de *V. cholerae* (DONG; MEKALANOS, 2012), *X. campestris* (LEE; WENG; TSENG, 2003; YANG et al., 2009) e *X. oryzae* (TIAN et al., 2015) e utilização de nutrientes por *X. citri* (GICHARU et al., 2016), mecanismos os quais são essenciais para a completa virulência do patógeno. Ainda assim, o papel do RpoN não é completamente elucidado em *X. citri* subsp. *citri*.

Em condições ambientais estressantes, como alterações de pH, déficit de fontes nutricionais, estresse oxidativo e outros, o fator sigma se liga à RNA polimerase, formando uma holoenzima, a qual, por sua vez, se liga a uma região promotora característica (5'-CTGGCACN / 5-TTGCA-3') na posição -24 e -12 pb anteriores ao códon inicial de transcrição dos genes a serem alterados (BEYON et al., 1983; GICHARU et al., 2016). Entretanto, estas posições da região promotora são variáveis, podendo chegar próximo a 200pb (LEE; WENG; TSENG, 2003; GICHARU et al., 2016; SHINGLER, 1996).

Uma vez regulada a transcrição, as expressões dos genes alvo e, conseqüentemente, as alterações nas atividades proteicas, são ativados ou desativados importantes mecanismos relacionados às ações patogênicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar o papel do gene *Xac0239* na patogenicidade e/ou virulência de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

3.2. Específicos

- a) Obter um mutante de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 para a ORF XAC0239 utilizando a estratégia de mutação por PCR por sobreposição e extensão, seguida por recombinação homóloga;
- b) Realizar testes de patogenicidade do mutante *in vivo*, utilizando laranja doce 'Pera Rio' e lima ácida 'Galego' como hospedeiro, em comparação com a Xac selvagem;
- c) Desenvolver curvas de crescimento do mutante *in vitro* e *in vivo*, na variedade laranja doce 'Pera Rio', em comparação com a da Xac selvagem;
- d) Fazer ensaios de motilidade, agregação bacteriana, formação de biofilme e goma xantana dos mutantes e degradação de celulose, em comparação com a Xac selvagem.
- e) Analisar a sequência da ORF XAC0239 pelos programas de modelagem molecular 'PHYRE²' e 'I-TASSER'.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção e análises *in silico* da ORF XAC0239

A ORF XAC0239 foi escolhida dentre várias ORFs de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, devido aos resultados obtidos pelas análises dos transcriptomas (CAVALLINI, 2013; COFRE, 2013; MURATA, 2013; PERON, 2014) disponibilizados nos bancos de dados. Foram feitas buscas por ORFs que codificavam proteínas hipotéticas e que apresentassem expressão gênica diferencial nos diferentes tempos (48 e 72 horas após a inoculação de *X. citri* subsp. *citri*) e variedades cítricas avaliados, para isto foram utilizados os critérios de $p\text{-value} \leq 0,05$ e de $\text{fold-change} \geq 2$ ou $\leq 0,5$.

Além das análises dos perfis transcricionais, foram realizadas pesquisas *in silico* nas bases de dados e ferramentas públicas “InterProScan” (FINN et al., 2016), “UniProt” (UNIPROT CONSORTIUM, 2018), “SignalP 4.0 Server” (PETERSEN et al., 2011), “BLASTn” e “BLASTp” (BORATYN et al., 2013).

4.2. Obtenção do DNA da ORF XAC0239

Para a construção do mutante foi utilizado DNA cosmidial proveniente da biblioteca de cosmídeos construída por da Silva e colaboradores (2002) na ocasião do sequenciamento da *X. citri* subsp. *citri* 306. O cosmídeo, denominado “00a08” estava armazenado no Centro de Recursos Biológicos (CREBio) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV)/UNESP campus de Jaboticabal e inserido em *Escherichia coli* DH10B. O “00a08” possui uma sequência de DNA que compreende, aproximadamente, as bases 260.000 a 300.000 do genoma de Xac (acesso: AE008923; região 260000..300000), região na qual está presente a ORF XAC0239.

A bactéria *E. coli* DH10B, foi plaqueada em meio de cultura LB (*Lysogeny Broth*) sólido (10g.L⁻¹ de triptona, 5g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10g.L⁻¹ de cloreto de sódio e 15g.L⁻¹ de ágar, pH 7,0) contendo o antibiótico canamicina (50µg.mL⁻¹). A placa foi incubada a 37°C por 16 horas em estufa bacteriológica e, em seguida, uma colônia isolada foi coletada e transferida para um tubo tipo falcon

de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultura líquido LB e canamicina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$). O tubo foi mantido a 37°C por 16 horas sob agitação de 180 rpm (rotações por minuto). Para a extração do cosmídeo foi utilizado o kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante e quantificado no equipamento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific) a partir do valor da absorbância a 260 nm.

4.3. PCR por sobreposição e extensão

Para a realização da mutação pela técnica de mutagênese sítio-dirigida por PCR por sobreposição e extensão foram desenhados quatro oligonucleotídeos, denominados A, B, C e D, de acordo com a sequência de nucleotídeos da região próxima à ORF XAC0239 presente na base de dados *Genbank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (acesso: AE008923; região: 287187..288945) (Figura 4).

>AE008923.1:287187-288945 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, complete genome

CGTGATCGAGGCCTGTCGCGCCAATGGCGTGCCGCGGCTGATC**TATACCTCCACGCCAGCG**
 TCACCCATCGCGCCACCAACCCGGTGGAAAGGACTCGGTGCCGATGAAGTGCCGTATGGCGAC
 GATCTGCGCGCCGCTACGCGGCGACCAAGGCCATTGCCGAACGTGCAGTGCTGGCCGCCAA
 CGATGCCCAGTTGGCGACAGTGGCACTGCGACCGCGCCTGATCTGGGGCCGGGCGACAATC
 ATTTGTTGCCGCGCTGGCAGCGGTGCGCGTGCCGGGCGGCTGCGCATGGTTCGGCGATGGC
 GGCAATCTGGTCGACAGCACGTACATCGACAACGCCGCGCAGGCGCATTTCGATGCGTTTCGA
 ACACCTTGCCGTGGGCGCTGCCTGCGCGGGCAGGGCGTACTTCATTTCCAACGGCGAACCGC
 TGCCGATGCGCGAGTTGCTCAATCGATTGCTGGCTGCGGTGGATGCGCCGGGCGGTACAGTGC
 TCGCTGTGCTTCAACACCGCCTACCGCATCGGTGCGGTGTGCGAGACGCTATGGCCACTGTT
 GCGTCTGCCAGGCGAAGTGCCGTTGACGCGTTTTCTGGTGGAACAGCTGTGTACGCCGATT
 GGTACAGCATGGAGCCGGCACGTGCGGACTTCGGCTATGTACCGCGCATCAGCATCGAAGAA
 GGCCTGCAACGGCTGCGATCCTCATCTTCCAACGACATCGCCATCACCCGATAAAGACCGGC
 ATATCCACAAGATACGTCTGCGCCGATTTCGGCACGACAACCTTCTGGATACCTTGCC**ATGCTG**
CATTACGCCATCATCTTCTTCGTTCATCGCCATCATCGCTGCTGTGCTGGGCTTTAGCGGTAT
CGCCGGTGC GGCGACCAACATCGCCTGGATCCTGTTTCGTGGTGTTCCTGATCCTGGCAGTGA
TCTCGATGTTCCGTGCGGGCAA**GGTATAACGCTTCGCTGC**GATACGTCACGGCAGCGGGCGCT
 CCCGGTTGGCGCTCACAGGGCCCCTTCCGCAAGGACCGGGCCCTGTGCGTTATGGCGGAA
 TATGACCGGGTTTTGGCTGATGACAGCTGTTTTCCAGACACTGCACATGCTTGCCACTGGCC
 AGCACGGCATCGCCGATCGCGCAAACCTCCAGCCCGCGATGCAGCGCCATCGAGGCGGGGTTG
 GCCAGCATCAGATTGACCTCGCACACCAGCCGCGCTGTCTTACTGCATGTGGCTGACGGAT
 GAGTTCGTTCATGCAGCTGCGTAGCAGATCGCGCCGACGTGCATGCGCGCCATCACGATGCCA
 TCGACATAACAACCCGTGCAAAGCGATCGGCCATCCCCCGAAATTTCGCAGTGGCATGACG
 CGCGTCTGGTCCAGCGCGAGCAATCGATAACGATCAGCACCGGCTCGAAGCGTCGCGGGTC
 CAGCGCATCCAGGATATCGCGCGCCGATTGCAACGAGACCTCGTGCTCGGCCGATTTGCCTC
 CGAAGATGAGGCCGACCCGAATCGTGCGCATTGCCTGCTCCTGCCATTGGAAGTGGACAGGA
 TGCCTGTGGCGTATGCGCTGAAGGACGTCTTGCCGCGAGACAGTGTGGCGAACAACGCCGGC
 ATGCCCGATGCGCCTGACCATGCGCCGCGCTGCCTAGCAACGACCGCACGACCGCTACACCG
 GCAGCCGGCGCACGTG**CCACACCGCCGTCAAG**CAGCTGCGACATGCAGGGGCGGTAGAATGC
 GGGCATGCCCGGATCACTCTTCA

Figura 4. Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC0239 (NCBI acesso: AE008923.1) e as regiões flanqueadoras correspondentes a, aproximadamente, 800pb *upstream* e *downstream* à ORF. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas em cinza, amarelo, azul e vermelho, respectivamente, e a região sublinhada corresponde à região nucleotídica da ORF XAC0239.

Aos oligonucleotídeos B e C foram adicionadas caudas com nove nucleotídeos complementares às sequências dos oligonucleotídeos C e B, respectivamente. E aos oligonucleotídeos A e D foram adicionados sítios de restrição das enzimas *Hind III* e *Eco RI* respectivamente, para posterior digestão (Tabela 3). As enzimas de restrição foram escolhidas de acordo com o mapa do vetor pNPTS138 (Figura 5).

Tabela 3. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante.

Nome do oligonucleotídeo*	Sequência (5' - 3')**	Sítio de Restrição***
XAC0239_A (F)	CGGAAGCTTTATACCTCCACGCCAGC	<i>Hind III</i>
XAC0239_B (R)	GTTTATACCGATGATGGC GTAATGCAGC	-----
XAC0239_C (F)	GCCATCATCGGTATAAAC GCTTCGCTGC	-----
XAC0239_D (R)	CATGTGAATTCTGCTTGACGGCGGTGTGG	<i>Eco RI</i>

*F, forward; R, reverse. **Regiões sublinhadas representam sítios de restrição adicionados; sequências realçadas representam caudas complementares adicionadas, onde as regiões de cores iguais se complementam. ***Sítios de enzimas de restrição adicionados.

Snabi.T7.SpeI.ApaI.MunI.NgoMI.KasI.HindIII.PstI.EcoRV.BamHI.EcoRI.NheI.EagI.MluI.BspEI.BsrGI.SphI.SalI.

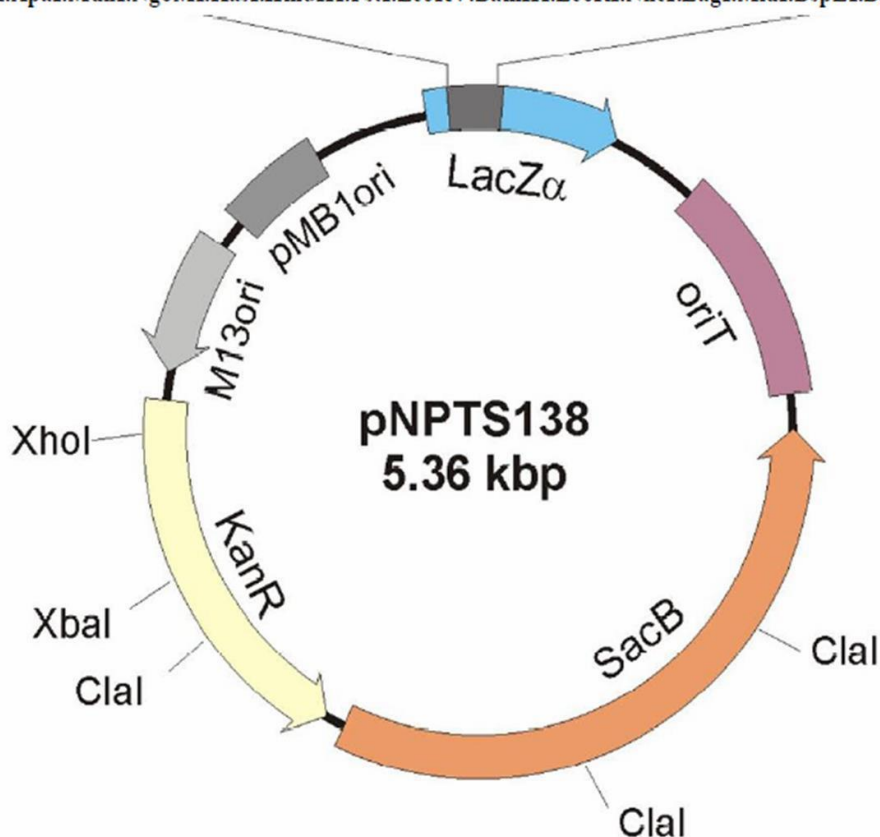


Figura 5. Mapa do vetor suicida pNPTS138. Fonte: Cappelletti (2010).

As reações de PCRs foram montadas separadamente, contendo 200µM de cada dNTP (deoxinucleotídeo), 0,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200ng de DNA cosmidial, 3% de DMSO (dimetilsulfóxido), 1X do tampão GC provido com a enzima, 0,4U de “Phusion® High Fidelity DNA Polymerase” (Thermo Scientific) e o volume completado com H₂O ultrapura estéril. Os programas de PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, 66°C por 15 segundos para a

PCRs AB e AD e 68°C para a PCR CD, 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. As amplificações foram confirmadas através de eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 10mg.mL⁻¹ de brometo de etídeo e tampão de corrida TBE (Tris-Borato-EDTA: 54g.L⁻¹ Tris base, 27,5g.L⁻¹ de ácido bórico, 20mL.L⁻¹ de EDTA a 0,5M, pH 8,0). Os géis foram visualizados e fotodocumentados em equipamento 'Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System' (Bio-Rad).

Nas PCRs para obtenção dos fragmentos AB e CD foram obtidas bandas únicas, assim, os produtos foram purificados diretamente com o kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega), de acordo com as instruções do fabricante e quantificados pelo equipamento NanoDrop® ND-1000. Na reação de PCR para a obtenção do fragmento AD outras bandas além da desejada foram observadas no gel, então foi preparada outra reação com volume final de 160µL, aplicado todo o volume em gel de agarose *low melting* a 1% (Genetic Analysis Grade – Fisher Scientific), e a banda de interesse (1554pb) foi recortada e purificada pelo método de fenol clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As concentrações e qualidade do DNA obtido foram mensuradas através do equipamento NanoDrop® ND-1000.

4.4. Clonagem no vetor suicida pNPTS138 e transformação de *E. coli*

Para a realização da clonagem do inserto obtido no vetor pNPTS138 ambos (vetor e inserto) foram digeridos e ligados. Para tal, o vetor pNPTS138 foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* (New England Biolabs - NEB) de acordo com a seguinte reação: 10µg de DNA (vetor pNPTS138), 1X de tampão NEB 2, 40U da enzima *EcoRI* (NEB), e o volume completado para 120µL com H₂O ultrapura estéril. A reação foi realizada em banho-maria durante 16 horas a 37°C. Em seguida, 400ng do vetor digerido foi aplicado em gel de agarose juntamente com o vetor não digerido para comprovar a efetivação da digestão. Após a comprovação, a enzima foi inativada por 20 minutos a 65°C, purificado pelo método de fenol clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) para a retirada de resíduos de tampão no meio e quantificados pelo equipamento NanoDrop® ND-1000.

Em seguida, os fragmentos foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* de acordo com a seguinte reação: 4,2µg do vetor previamente digerido com *EcoRI*, 1X de tampão NEB 2, 40U da enzima *HindIII* (NEB), e o volume completado para 120µL com H₂O ultrapura estéril. A reação foi incubada por 16 horas a 37°C em banho-maria e mantida a 80°C por 20 minutos para inativação da enzima.

O inserto referente ao fragmento AD foi digerido com as mesmas enzimas citadas anteriormente, em apenas uma reação, com condições semelhantes às das digestões do vetor, entretanto, foram usados 4µg de DNA e 1X do tampão NEB 3.1. As enzimas foram inativadas por incubação a 65°C durante 20 minutos e a recuperação do material digerido foi feita a partir de gel de agarose *low melting* e purificação com Kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega), de acordo com as instruções do fabricante e quantificado em espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000.

A ligação do inserto ao vetor pNPTS138 foi realizada com 400U da enzima *T4 ligase* (Fermentas), 1X do tampão da enzima, 90ng de vetor, 200ng de inserto e completado o volume para 20µL com H₂O ultrapura estéril. A reação foi incubada a 16°C por 16 horas em termociclador e, após o fim da ligação, armazenada a -20°C.

O vetor resultante *pNPTS-XacΔ0239* foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B termocompetentes. A transformação foi realizada de acordo com o método proposto por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) em que, em um microtubo de 1,5mL foram adicionados 5µL da ligação e 100µL de suspensão de células de *E. coli* termocompetentes, misturadas gentilmente e mantidas no gelo por 30 minutos. Em seguida, os microtubos foram colocados em banho-maria a 42°C por 90 segundos e rapidamente transferidos para o gelo, onde foram mantidos por 2 minutos para ocorrer o choque térmico. Após o choque térmico foram adicionados 900µL de meio SOC [9,7mL de meio SOB (20g.L⁻¹ de triptona; 5g.L⁻¹ de extrato de levedura; 0,5g.L⁻¹ de NaCl; 2,5g.L⁻¹ de KCl); 200µL de glicose 1M; 100µL de MgCl₂ 1M] e incubados a 37°C a 150 rpm para a expressão do gene de resistência.

Em seguida, 200µL da transformação foram plaqueados em meio sólido LB contendo 50µg.mL⁻¹ de canamicina, 0,1mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) e 0,0032% de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-

galactosidase), uma vez que o vetor pNPTS138 é resistente a este antibiótico e a clonagem interrompe o gene *Lac-Z* pertencente ao vetor, sendo possível fazer a seleção das colônias transformantes por meio de colônias brancas.

Das colônias transformantes, foram extraídos plasmídeos via kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante para realização de uma reação de sequenciamento pela plataforma ABI3730XL, no Centro de Recursos Biológicos (CREBio) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) campus de Jaboticabal, com o vetor *pNPTS138-XacΔ0239* para a comprovação da identidade do fragmento clonado. As sequências obtidas foram analisadas por meio da ferramenta “BLASTn” (NCBI).

4.5. Transformação em células eletrocompetentes de *X. citri* subsp. *citri*

Após confirmação da mutação, 1,5µg da construção *pNPTS-XacΔ0239* foi usado para transformação em células eletrocompetentes de *Xac*. As células foram preparadas a partir de um pré-inóculo com 5mL de meio NB, crescido a 29°C e rotação de 180rpm. Após 8 horas de crescimento, 2mL do pré-inóculo foram transferidos para 200mL de meio NB e incubados a 29°C e rotação de 180rpm por 16 horas. Após crescimento, o inóculo foi transferido para quatro tubos tipo falcon de 50mL e centrifugados por 15 minutos a 4000rpm. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o *pellet* ressuscitado em H₂O ultrapura estéril. O *pellet* ressuscitado dos quatro tubos foi transferido para dois tubos e o volume completado para 50mL. Este processo de lavagem e ressuspensão foi repetido até que restasse apenas um tubo. O conteúdo deste foi aliquotado em 100µL e utilizado em seguida.

O processo de eletroporação foi realizado com 1500ng do plasmídeo *pNPTS138-XacΔ0239* e 100 µL de células eletrocompetentes de *Xac*. Foi utilizado o equipamento “Gene Pulser Xcell™ System” (Bio-Rad) com as condições de 1250V, 10µFd de capacitância, 450Ω de resistência e tempo constante de 2,6ms em uma cubeta de 0,1cm (Bio-Rad).

A recuperação das células foi feita durante quatro horas por 150rpm a 29°C, em 1mL de meio de cultura NBY (8g.L⁻¹ de caldo nutriente, 2g.L⁻¹ de

extrato de levedura, 2g.L^{-1} de K_2HPO_4 , $0,5\text{g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 e $2,5\text{g.L}^{-1}$ de glicose) suplementado com 20% de glicose e 1M de MgSO_4 .

Após a recuperação celular, foram plaqueados $200\mu\text{L}$ em meio de cultura NA contendo $50\mu\text{g}$ de canamicina. Das colônias transformantes, três foram transferidas para tubos tipo Falcon de 50mL com meio NB acrescido de canamicina, e incubadas por 16 horas a 29°C , sob agitação constante de 180rpm para ocorrer o primeiro evento de recombinação entre as regiões homólogas. Com estes inóculos foram feitas diluições em série (1/10, 1/100 e 1/100) e $100\mu\text{L}$ de cada diluição plaqueados em NA com sacarose a 5% e incubados a 29°C por 72 horas para que ocorresse o segundo evento de recombinação e a eliminação do plasmídeo da célula bacteriana, já que o gene *sacB* é um marcador de seleção, em presença de sacarose. As confirmações das colônias mutantes obtidas foram feitas por meio de reações de PCRs de colônias utilizando os oligonucleotídeos A e D e como controle a *Xac* selvagem.

Após a confirmação da *Xac* mutada por PCR de colônia, uma colônia foi submetida ao crescimento, extração de DNA e sequenciamento pela plataforma ABI3730XL, no Centro de Recursos Biológicos (CREBio) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) campus de Jaboticabal, confirmando a identidade da mutação em *Xac*.

4.6. Teste de patogenicidade

O teste foi realizado como descrito por Laia et al. (2009) e Yan e Wang (2011), com adaptações. Massas de células bacterianas, provindas de colônias isoladas, foram crescidas em 10mL de meio de cultura NB até a fase *log* de crescimento (~16 horas). Estas foram centrifugadas durante 15 minutos a temperatura ambiente a 16000g , o *pellet* formado foi ressuspenso em água de torneira estéril até atingir uma densidade óptica a 600nm de $0,3 [10^8 \text{ UFC (Unidades Formadoras de Colônias).mL}^{-1}]$ e diluído seriadamente até uma concentração de 10^6 UFC.mL^{-1} . As inoculações foram feitas em folhas jovens em expansão (imaturas) de plantas moderadamente resistentes ao cancro cítrico, laranja 'Pera Rio' (*Citrus sinensis*), e altamente suscetível, lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia*) (Tabela 1), utilizando-se três repetições de cada variedade, as quais foram mantidas em laboratório destinado exclusivamente para essa

finalidade e equipado com fotoperíodo (12 horas de escuro/12 horas de luz) e temperatura (27°C) adequados. As folhas foram inoculadas por infiltração das suspensões bacterianas com seringa hipodérmica sem agulha, diretamente no mesófilo foliar, sendo a Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante) inoculadas no lado direito e esquerdo, respectivamente, ambos na parte abaxial das folhas. Água estéril foi utilizada como controle, e as folhas foram fotodocumentadas aos 2, 5, 8, 11, 15 e 20 dias após a inoculação (DAIs) para comparação visual dos sintomas.

4.7. Curva de crescimento bacteriano *in vitro*

A curva *in vitro* foi realizada como descrito por Lacerda et al. (2017), com adaptações, no Laboratório de Genética de Bactérias do Instituto de Biociências, pertencente à UNESP, campus de Rio Claro.

Os inóculos foram preparados crescendo-se as estirpes Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante) em meio de cultura líquido NB, por 16 horas, a 180rpm. As concentrações foram ajustadas em função da DO a 600nm igual a 0,1 através da adição de meio de cultura. Após diluição, 1,5 mL de cada cultura foi transferido para placas de 24 poços, transparentes e estéreis, e o meio de cultura líquido NB foi usado como controle. As placas foram incubadas em um equipamento leitor de placas do modelo “Spectra Max M2” (Molecular Devices) por 24 horas e as leituras das densidades ópticas (600nm) feitas a cada 30 minutos. Os dados foram computados pelo Software “SoftMax Pro User” (Molecular Devices), vinculado ao equipamento. Foram realizadas quatro repetições para cada estirpe.

4.8. Curva de crescimento bacteriano *in vivo*

O crescimento *in vivo* foi avaliado segundo método descrito por Laia et al. (2009), com adaptações. Os inóculos bacterianos foram preparados da mesma forma que para o teste de patogenicidade, entretanto o *pellet* formado foi ressuspenso em PBS 1X (Tampão Fosfato-Salino) estéril (PBS 10X, contendo 80g.L⁻¹ de NaCl, 2 g.L⁻¹ de KCl, 14,4 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 2,4 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, pH 7,4). As suspensões bacterianas foram inoculadas por infiltração utilizando

seringa hipodérmica de tuberculina sem agulha, em dois pontos por folha, pela parte abaxial. Foram utilizadas seis plantas de laranja doce 'Pera Rio' (repetições biológicas) e inoculadas aproximadamente 8 folhas por planta, para cada cepa bacteriana. As coletas do material vegetal foram feitas aos 0, 1, 3, 6, 10 e 15 dias após a inoculação (DAI). A quantificação do número de células por área foi determinada destacando-se, aleatoriamente, duas folhas por planta (referentes às folhas inoculadas com Xac WT e Xac Δ 0239), lavadas durante 30 segundos em 0,5% de hipoclorito de sódio e 30 segundos em H₂O ultrapura estéril, para esterilização da superfície foliar. Após a lavagem das folhas, dois discos foliares de 0,75 cm² (réplicas técnicas) foram coletados nas áreas inoculadas, e macerados em um mL de PBS 1X (pH 7,0). As soluções foram seriadamente diluídas até 10⁻¹², quando necessário, com PBS 1X adicionado de Tween 80 a 0,3%. Para a contagem do número de colônias bacterianas, 10 μ L de cinco diluições foram gotejados em meio de cultura NA, segundo o método de microgota (Romeiro, 2005). O Tween 80 a 0,3% adicionado ao PBS 1X permite maior dispersão da gota na placa, facilitando a contagem das colônias bacterianas. As UFC.mL⁻¹.cm⁻² foram contadas após 48 a 72 horas de incubação a 29°C.

4.9. Ensaio de motilidade *swimming* e *swarming*

Os testes de motilidade bacteriana *swimming* e *swarming* foram realizados de acordo como descrito por Guzzo et al. (2009) e Malamud et al. (2011), com adaptações. Os inóculos bacterianos foram preparados da mesma forma que o teste de crescimento *in vitro*. As densidades ópticas a 600nm foram ajustadas para 0,3 e estas foram utilizadas para gotejamento de duas gotas de dois μ L em lados opostos de placas de Petri com meio de cultura NB a 0,3% (10g.L⁻¹ de triptona, 5g.L⁻¹ de NaCl, 3g.L⁻¹ de ágar) e NB 0,7% (10g.L⁻¹ de triptona, 5g.L⁻¹ de NaCl, 7g.L⁻¹ de ágar). Foram utilizadas três colônias de cada cepa (repetição biológica) e quadruplicatas para cada colônia (repetição técnica). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 29°C por 48 horas. Após crescimento, as placas foram fotodocumentadas em equipamento 'Gel DocTM XR+ Gel Documentation System' (Bio-Rad) e medidos os diâmetros (cm) das

colônias, e com isso, calculadas as áreas (cm²) através do *Software* “ImageJ” (*National Institute of Health*).

4.10. Ensaio de agregação bacteriana

Os inóculos bacterianos foram preparados em 15 mL de meio de cultura NB, incubando-se por 20 horas a 29°C e rotação de 180rpm. As densidades ópticas a 600nm foram ajustadas para 2,0 e transferidos 10mL de cada inóculo para tubos de borosilicato estéreis.

Inicialmente, as suspensões bacterianas foram vigorosamente agitadas durante 15 segundos, para então dar início as aferições. As concentrações foram medidas a partir das densidades ópticas a 600nm. Para a aferição da densidade óptica, a cada hora, 100µL de cada amostra foram retirados na altura de um cm da superfície da cultura e adicionados a 900µL de meio de cultura NB.

Durante o experimento os tubos permaneceram estáticos para propiciarem a agregação das células bacterianas. As leituras foram feitas durante 12 horas consecutivas, além de uma leitura extra 24 horas após o início do experimento. As densidades ópticas foram multiplicadas por 10 para reparar o efeito da diluição. Foram feitas três repetições biológicas e quatro técnicas para cada cepa.

4.11. Formação de biofilme bacteriano

A formação de biofilme *in vitro* foi feita como descrito por Guo et al., (2010), Rigano et al. (2007) e Yan e Wang (2011), com adaptações. As células bacterianas foram ressuspendidas em meio de cultura NB e XVM2 (20mM NaCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 5mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 0,16mM KH₂PO₄, 0,32mM K₂HPO₄, 0,01mM FeSO₄, 10mM frutose, 10mM sacarose, 0,03% casaminoácidos, pH 6,7) acrescido de 1% de glicose até uma densidade óptica a 600nm de 0,3, e um mL de cada cultura foi transferido para tubos de borosilicato estéreis e incubados a 29°C por 96 horas, sem agitação. Após este período de formação do biofilme e aderência nas paredes dos tubos, os meios foram transferidos para microtubos e centrifugados por 15 minutos a 16.000g. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet*, foram adicionados 200µL de cristal violeta a 0,1%, e deixados durante 45

minutos estáticos. Aos tubos de borosilicato o mesmo procedimento foi seguido, adicionando-se 1mL de cristal violeta a 1% para corar o biofilme formado nas paredes. Após 45 minutos, as soluções de cristal violeta dos microtubos e dos tubos de borosilicato foram descartados e estes foram lavados com um mL de H₂O ultrapura estéril e um mL de solução etanol:acetona (80:20) para solubilização do biofilme aderido às paredes dos tubos. De cada solução obtida, foram transferidos 100µL para poços de placas de 96 poços e aferidas as absorvâncias em espectrofotômetro a 595nm.

Para cada estirpe bacteriana foram feitas quatro réplicas biológicas e quatro réplicas técnicas.

4.12. Formação de goma xantana

A aferição da produção de goma xantana foi realizada como descrito por Guo et al. (2010), com adaptações. Os inóculos bacterianos foram preparados em 10mL de meio de cultura NB, da mesma forma que para o teste de crescimento *in vitro*. Dessas suspensões, 2,5mL de cada suspensão bacteriana foram transferidos para 100mL de meio de cultura que estimula a produção de goma xantana (25g.L⁻¹ de glicose, 3g.L⁻¹ de extrato de levedura, 2g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,1g.L⁻¹ de MgSO₄ x 7H₂O, pH 7,0) (SOUW; DEMAIN, 1979) em *Erlenmeyers* de 250mL. Os inóculos foram incubados a 29°C a 180rpm por 96 horas.

Para a extração da goma, os 100mL foram centrifugados a 10.000g, a 4°C, por 40 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para béquers de 500mL, adicionados 4g de KCl e agitados por 15 minutos. Após completa dissolução do KCl, foram adicionados 200mL de isopropanol gelado e agitados com bastão de vidro até a formação da goma, a qual foi extraída da solução, transferida para copos plásticos de 50mL e armazenadas em estufa a 37°C por 72 horas. Os *pellets* obtidos após centrifugação foram ressuspensos em um mL de H₂O ultrapura estéril, transferidos para béquers de 80mL e armazenados em estufa a 70°C por 24 horas. Após secagem das amostras, estas foram pesadas para obtenção do peso seco de células e de goma xantana produzidas. Para cada estirpe foram feitas quatro réplicas técnicas.

4.13. Teste de degradação de celulose

Para avaliar a capacidade do mutante em degradar a celulose foi realizado o teste como descrito por Baptista et al. (2010), com adaptações. Para isto, foram preenchidos os poços de placas do tipo *Deep Well* com 1,1mL de meio de cultura NB e, em diferentes poços, crescidas as estirpes (selvagem e mutante). A placa foi incubada por 48 horas a 29°C e rotação de 250rpm.

Após crescimento das culturas, foram plaqueadas com auxílio de um replicador estéril em placas de Petri de 15cm com meio de cultura contendo o composto carboximetilcelulose (CMC) (0,5% de CMC, 0,1% de NaNO₃, 0,1% de K₂HPO₄, 0,1% de KCl, 0,05% de MgSO₄, 0,05% de extrato de levedura, 0,1% de glicose e 1,7% de ágar), e as placas incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 29°C.

Após crescimento das colônias, estas foram removidas da placa com H₂O ultrapura estéril, com o auxílio de uma pisseta. As superfícies das placas foram cobertas com solução de corante Vermelho Congo (0,1%) por 15 minutos e este foi, logo em seguida, neutralizado com lavagens por 15 minutos com 1M de NaCl.

Os fenótipos para atividade de CMCase foram registrados através de fotodocumentador 'Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System' (Bio-Rad). A partir das imagens, foram medidos os diâmetros das colônias (C) e dos halos (H) formados por cada uma com o auxílio do *software* 'ImageJ'. As regiões em que houve degradação da celulose no meio apresentaram-se sem coloração vermelha (CHATTERJEE et al., 1995; SPIRIDONOV; WILSON, 2000). Para a aferição da degradação foi feito o seguinte cálculo: $(H^2 - C^2)/C^2$ e foram realizadas 128 réplicas técnicas para cada estirpe.

4.14. Modelagem molecular

Para o estudo das estruturas proteicas, a sequência fasta de aminoácidos da ORF XAC0239 foi submetida a dois programas de modelagem molecular: o PHYRE2 (Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0) (KELEY et al., 2015) e o I-TASSER (Iterative Threading ASSEmble Refinement V 5.1) (YANG et al., 2015).

4.15. Análises estatísticas

Os dados dos experimentos de motilidade *swimming* e *swarming*, biofilme em meios XVM2 e NB, goma xantana e degradação de celulose foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) por meio do *software* computacional AgroEstat® (BARBOSA; MALDONADO JR, 2015).

5. RESULTADOS

5.1. Seleção e análises *in silico* da ORF XAC0239

A análise feita no banco de dados “*XanthostKB*” – “*Knowledge Base for Transcriptome of Xanthomonas citri subsp. citri 306 Interactome*” (HERAI, dados não publicados) revelou um perfil de expressão diferencial do gene XAC0239. Na Figura 6 estão demonstrados os valores de expressão relativos desses transcritos (*fold-change*) nas oito variedades cítricas contrastantes em relação à suscetibilidade (Tabela 2).

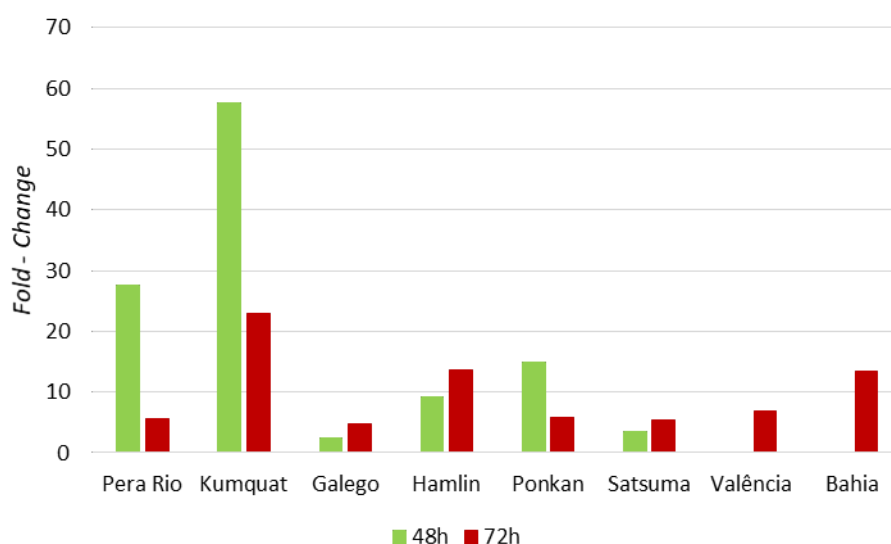


Figura 6. Perfil transcricional relativo (*fold-change*) da ORF XAC0239 em oito genótipos de citros e relativos contrastantes em relação à suscetibilidade ao cancro cítrico em 48 (verde) e 72 (vermelho) horas após a inoculação com Xac.

É possível observar que, em todas as variedades, houve superexpressão gênica em pelo menos um tempo analisado (48 ou 72 horas). Ressalta-se que, na variedade 'Kumquat', a mais resistente entre elas, o perfil transcricional foi o mais elevado. Um perfil elevado de transcrição também foi observado na espécie 'Pera Rio', a qual é moderadamente resistente.

As análises *in silico* da proteína XAC0239, revelaram que a mesma pertence à superfamília PRK13682, possui um domínio DUF (Domain of Unknown Function) 1328, das bases 6 a 44, e é classificada como componente celular de membrana plasmática (CDD – Conserved Domain Database). Além disso, provavelmente, não é secretada por não possuir peptídeo sinal (SignalP 4.0) (Figura 7).

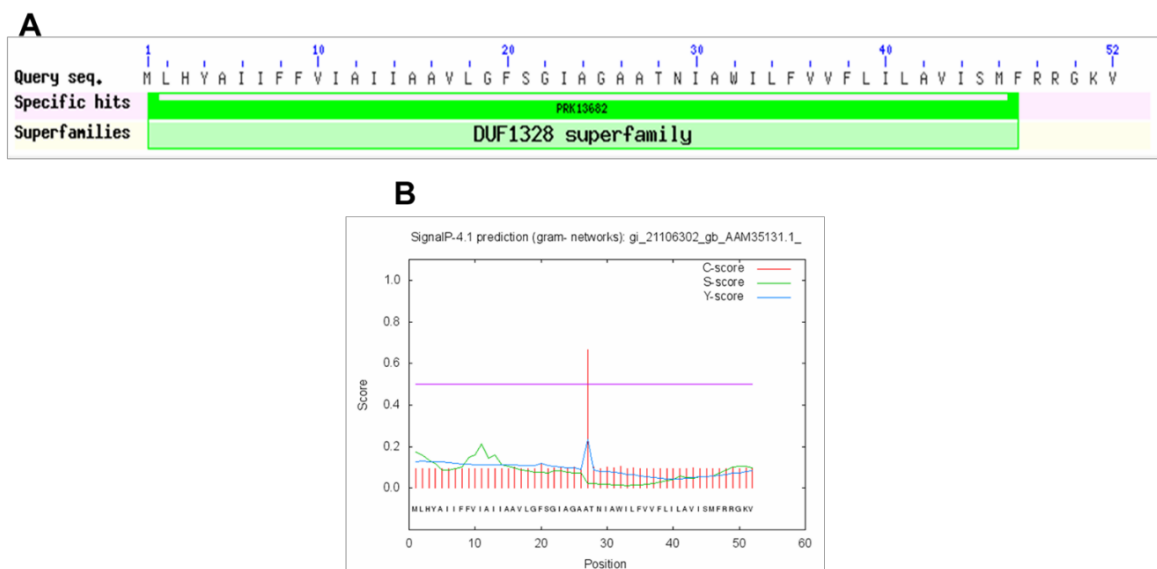


Figura 7. Resultados da busca *in silico* nas bases de dados (A) CDD (NCBI) e (B) SignalP 4.0.

Genes regulados pelo fator σ^{54} , ou RpoN, possuem uma região promotora parcialmente conservada em diversos organismos (5'-CTGGCACN / 5-TTGCA-3'), próxima à região -24/-12 a montante do códon inicial de transcrição (GICHARU et al, 2016; LEE et al., 2003; SHINGLER et al., 1996). A busca por esse promotor na ORF XAC0239 revelou estar presente na região -27/-3 (Figura 8).

```

ACAAGATACGTCTGCGCCGATT-27CGGCACGACAAC-3TTCTGGATACCTTGCCATGCTGCATTACGCCATCATCTTCTTCGT
CATCGCCATCATCGCTGCTGTGCTGGGCTTTAGCGGTATCGCCGGTGCGGCGACCAACATCGCCTGGATCCTGTTCGTG
GTGTTCCCTGATCCTGGCAGTGATCTCGATGTTCCGTGCGGCAAGGTATAA

```

Figura 8. Sequência nucleotídica da ORF XAC0239 (em negrito) e 50 nucleotídeos a montante. As sequências sublinhadas representam a região promotora, as sequências coloridas, as tricas dos códons de iniciação (verde) e de terminação (vermelho).

5.2. Obtenção do mutante para a ORF XAC0239

O mutante de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 foi obtido através da estratégia de mutação sítio-dirigida de PCR por sobreposição e extensão, na qual foi excluído um fragmento de 131pb, correspondente à parte da ORF XAC0239. Esta ORF possui 159pb, entretanto foi excluída uma região menor devido aos oligonucleotídeos B e C estarem, respectivamente, completo e parcialmente ancorados dentro da região que corresponde à ORF XAC0239 (rosa). Na Figura 9, estão demonstradas as localizações dos sítios de anelamento de cada oligonucleotídeo (lilás) na sequência.

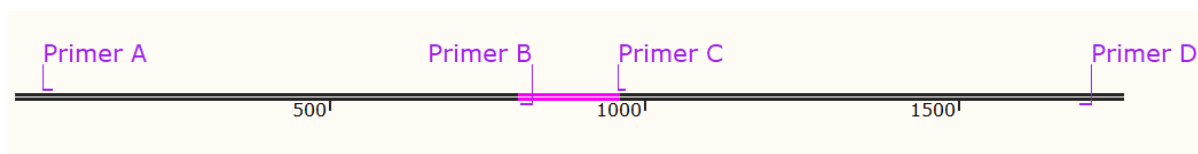


Figura 9. Localização dos sítios de anelamento dos oligonucleotídeos (*primers*) A, B, C e D e suas respectivas orientações em relação ao genoma da Xac. A região em rosa representa a ORF XAC0239. Mapa desenhado a partir do *software* 'SnapGene® Viewer' versão 4.1.2.

A Figura 10 apresenta um esquema da deleção parcial da ORF XAC0239, estando a região deletada representada em vermelho (131pb). Com a ligação das regiões AB (787pb) e CD (767pb), por meio de caudas complementares, foi

formado um fragmento AD (1554pb), o qual possui apenas 28pb da sequência original da ORF XAC0239.

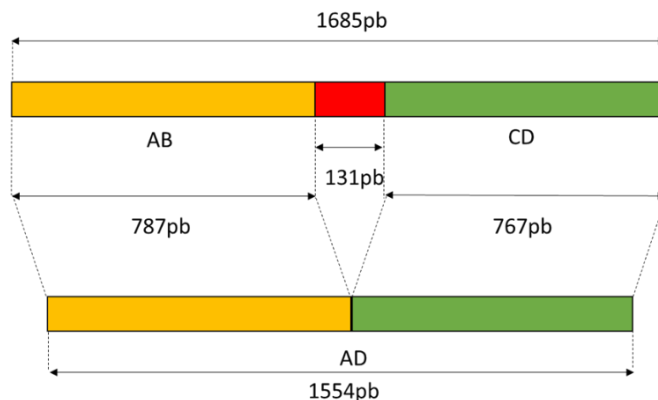


Figura 10. Diagrama esquemático do processo de deleção da ORF XAC0239, mostrando a região de deleção com os respectivos fragmentos de DNA AB e CD que, quando unidos, formam o fragmento AD.

As amplificações, via PCR, dos fragmentos acima citados apresentaram os tamanhos esperados, como pode ser visualizado na Figura 11. O fragmento AD (sem a deleção), apresentou 1685pb, os AB e CD, obtidos através das PCRs primárias, apresentaram os tamanhos de 787pb e 767pb, respectivamente, e o fragmento AD Δ (com a deleção), obtido na PCR secundária, apresentou o tamanho de 1554pb.

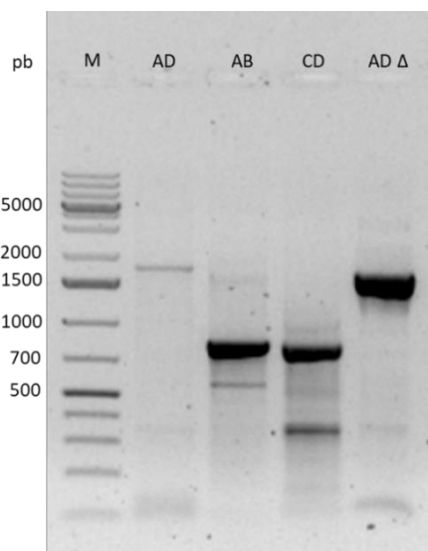


Figura 11. Eletroforese em gel demonstrando os tamanhos dos fragmentos de DNA amplificados via PCR: AD (1685pb), AB (787pb), CD (767pb) e AD Δ (1554pb). M - padrão de peso molecular "O'GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder" (Thermo Fisher). Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo ($10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Na Figura 12 é apresentado o resultado da análise pela ferramenta BLASTn comparando parte da sequência genômica da Xac 306 com a sequência obtida com o sequenciamento do mutante Xac Δ 0239. Pela análise é possível verificar que houve deleção de parte da ORF XAC Δ 0239, como desejado.

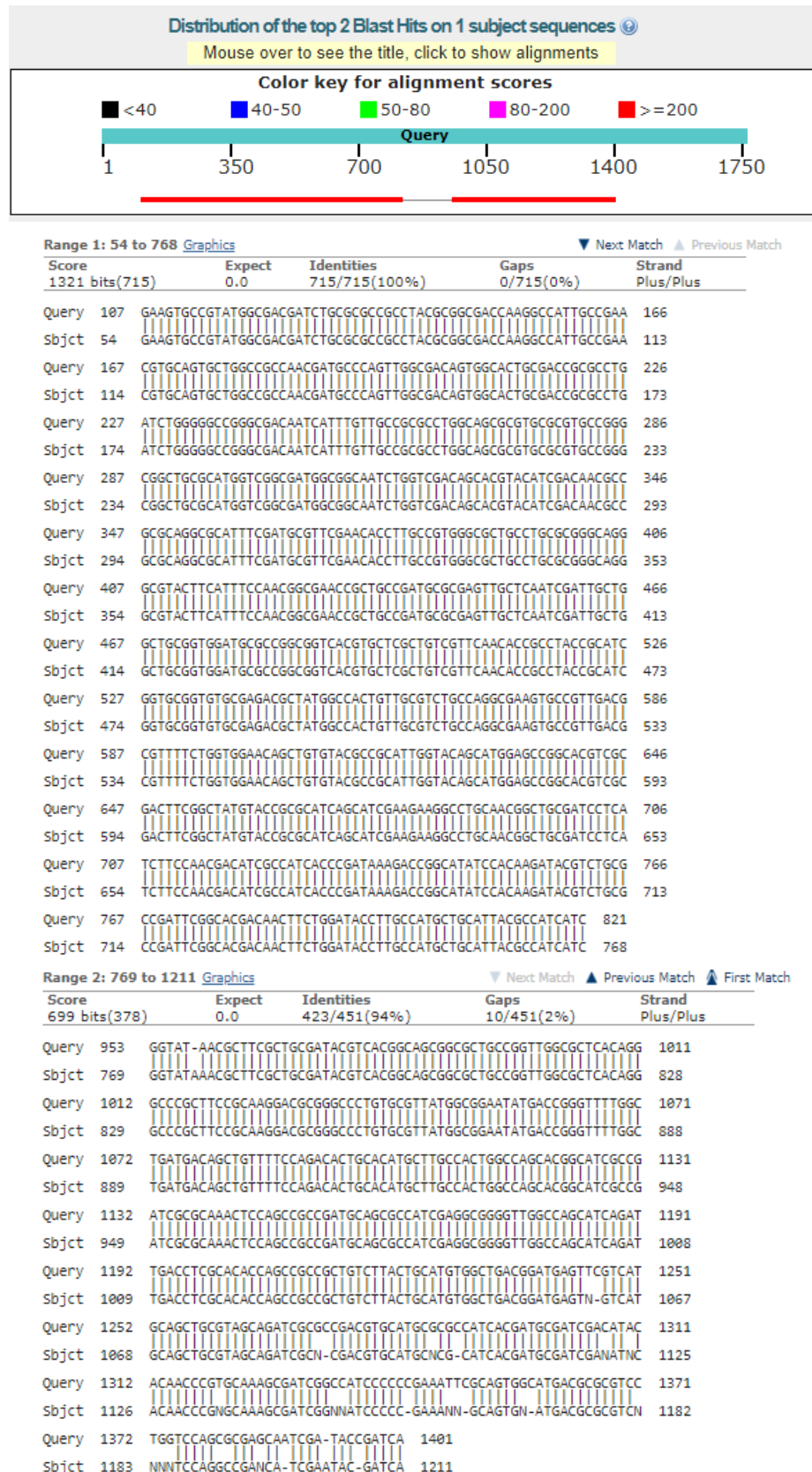


Figura 12. Alinhamento pela ferramenta BLASTn. (A) Esquema da sequência da XacΔ0239 em relação à sequência genômica da Xac 306. (B) Comparação nucleotídica do fragmento AB. (C) Comparação nucleotídica do fragmento CD.

5.3. Teste de Patogenicidade

Os testes de patogenicidade confirmaram que houve diminuição nos sintomas causados pelo mutante quando comparado com a cepa selvagem em lima ácida 'Galego' e laranja doce 'Pera Rio'. As cepas apresentaram sintomas típicos de cancro cítrico, porém as áreas infectadas com o mutante apresentaram menor encharcamento e formação de pústulas em comparação ao selvagem (Figuras 13 e 14).

Na Figura 13 está demonstrada a evolução da doença na variedade lima ácida 'Galego', na qual se observa o início de encharcamento na região inoculada com a Xac selvagem (Xac WT) a partir do quinto dia após a inoculação (DAI), principalmente na parte abaxial da folha, sendo os sintomas acentuados ao longo dos dias. Na região inoculada com a Xac mutante (Xac Δ 0239), é possível observar clorose a partir do oitavo DAI e pequenas áreas encharcadas a partir do 15° DAI.

Para a variedade laranja doce 'Pera Rio' ao 5° DAI iniciaram-se os sintomas de encharcamento e, ao 8° DAI, de clorose, sendo que ao 15° DAI as áreas necrosadas foram facilmente detectadas na região inoculada com a Xac selvagem (WT). Já para a Xac mutante (Xac Δ 0239), ao 11° DAI, foi notável a formação de pústulas, que aumentaram ao longo dos dias (Figura 14).

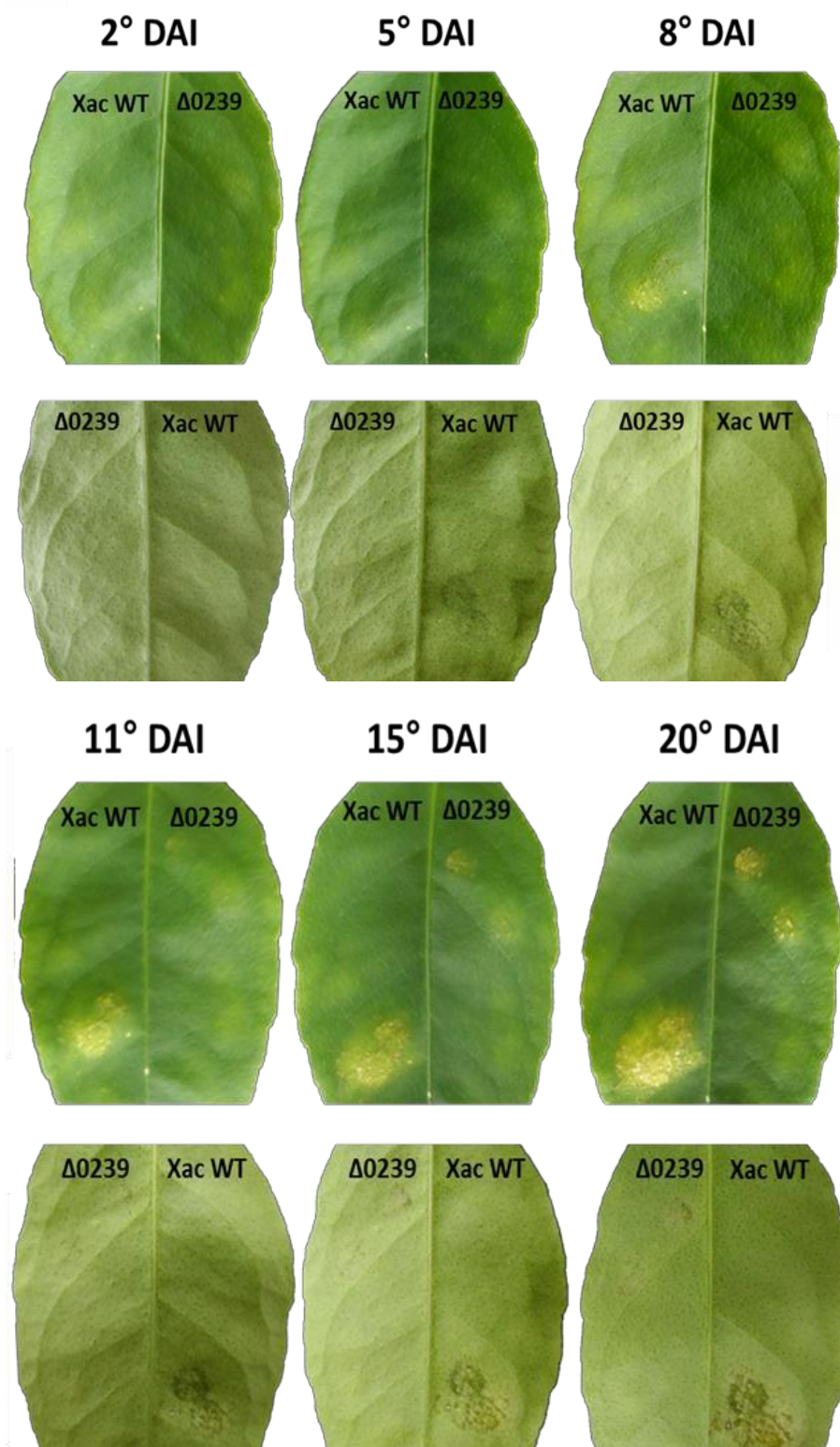


Figura 13. Fotodocumentação do teste de patogenicidade na variedade lima ácida 'Galego' em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. Sintomas observados aos 2, 5, 8, 11, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI) das linhagens Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante). Estão representadas as superfícies adaxial (quadro superior) e abaxial (quadro inferior) das folhas.

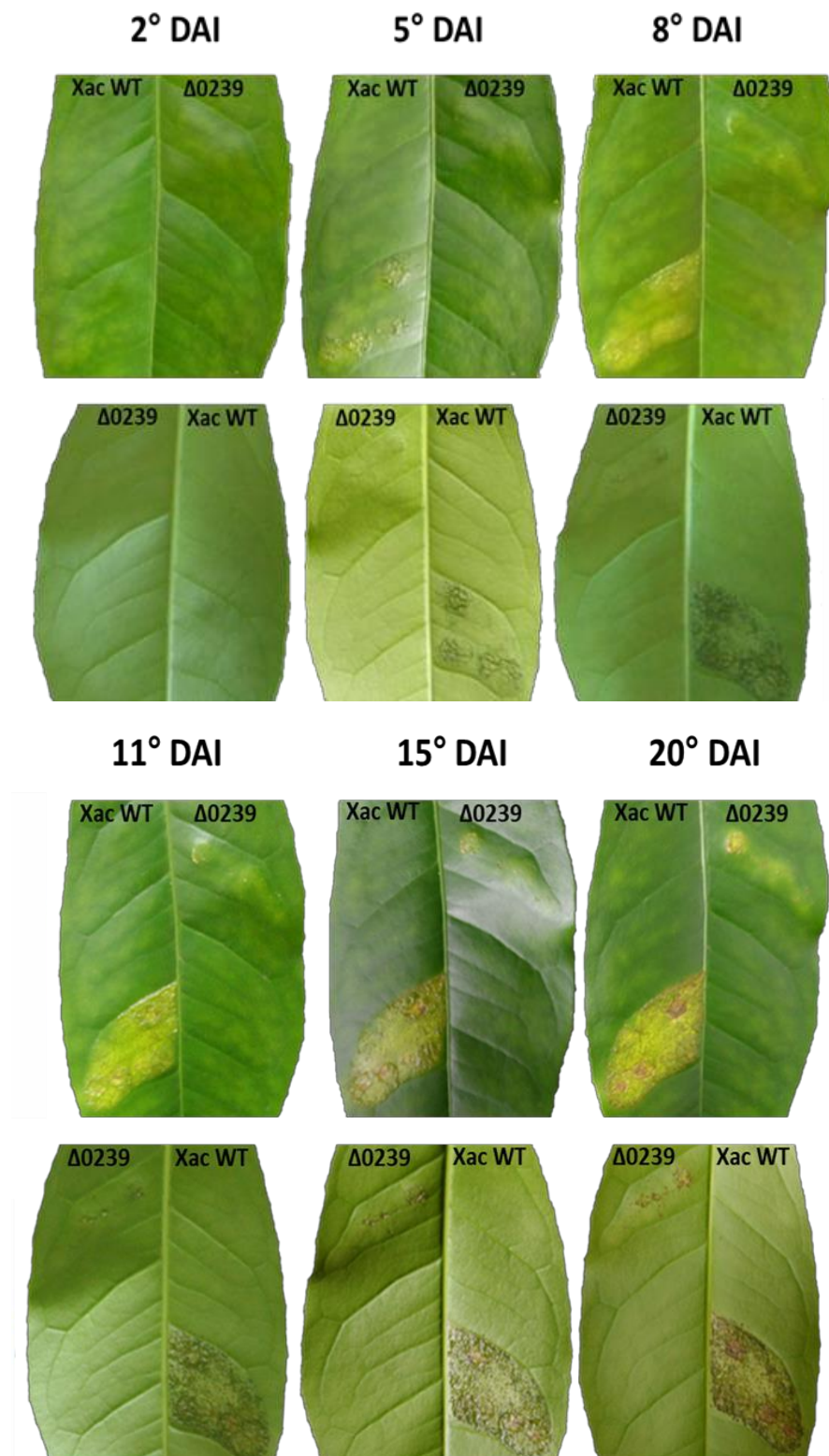


Figura 14. Fotodocumentação do teste de patogenicidade na variedade laranja doce 'Pera Rio' em concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. Sintomas observados aos 2, 5, 8, 11, 15 e 20 dias após a inoculação (DAI) das linhagens Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante). Estão representadas as superfícies adaxial (quadro superior) e abaxial (quadro inferior) das folhas.

5.4. Curvas de crescimento bacteriano

Para verificar a influência da mutação na ORF XAC0239 no desenvolvimento da *Xac in vitro* foi avaliado o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido NB. Já para avaliar os efeitos da mutação no desenvolvimento temporal da doença, foi avaliado o crescimento bacteriano (*in vivo*) em plantas de laranja doce 'Pera Rio' (moderadamente resistente).

Na curva de crescimento *in vitro* não houve diferenças entre as cepas WT e *Xac*Δ0239 durante as 24 horas avaliadas, sendo que as fases *lag*, *log*, estacionária e de declínio se deram, respectivamente, entre os tempos 0 a 2, 2 a 12, 12 a 21 e 21 a 24 horas (Figura 15).

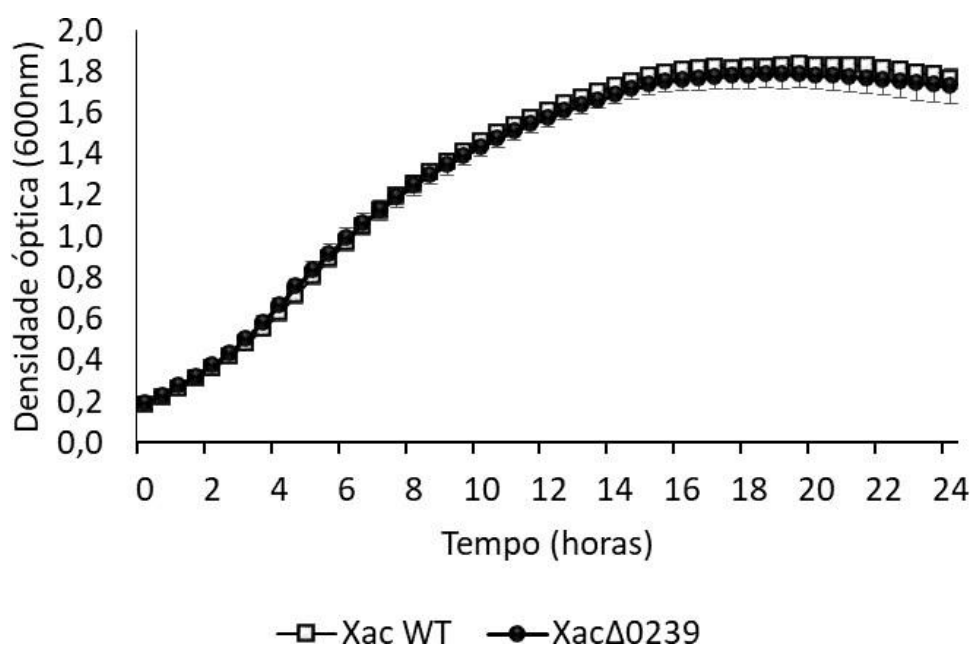


Figura 15. Curva de crescimento bacteriano *in vitro*, contrastando-se o crescimento da *Xac* WT (selvagem) e da *Xac*Δ0239 (mutante). Os valores representam as médias das densidades ópticas por tempo de avaliação (horas). As barras representam os erros padrão.

In vivo, as cepas mutante e selvagem foram capazes de crescer, entretanto, foi o processo de multiplicação do mutante se deu mais lentamente, se intensificando a partir do sexto DAI ($p < 0,5$) (Figura 16).

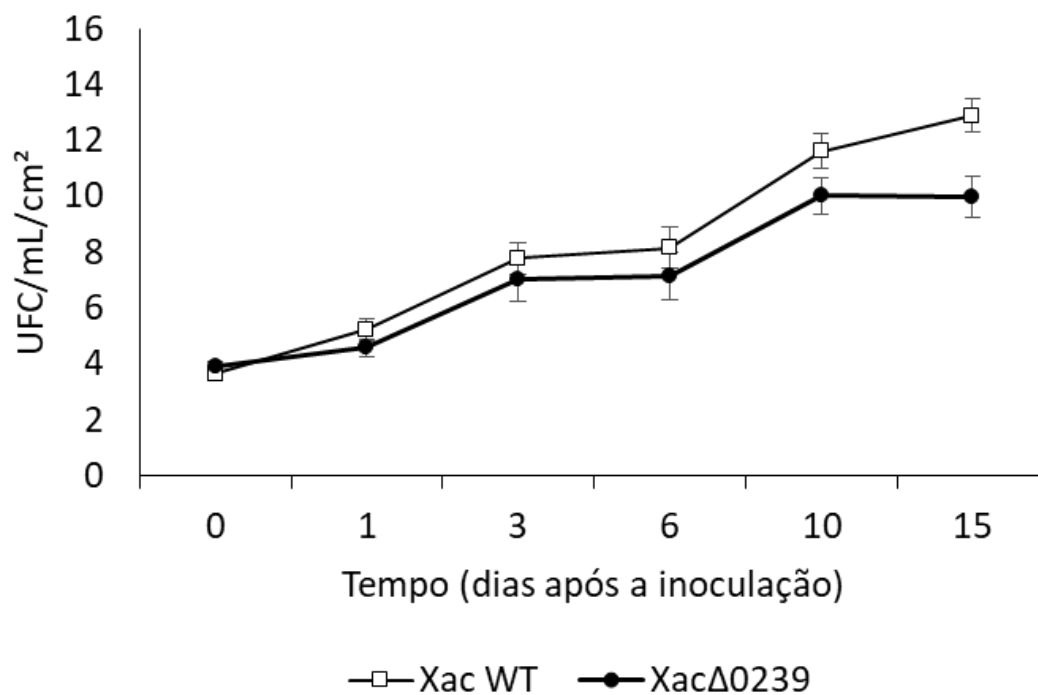


Figura 16. Curva de crescimento bacteriano *in vivo* na variedade laranja doce 'Pera Rio', contrastando-se o crescimento da Xac WT (selvagem) e da XacΔ0239 (mutante). Os valores representam as médias das UFC/mL/cm² por tempo (dias após a inoculação). As barras representam os erros padrão ($p \leq 0,5$).

5.5. Motilidade bacteriana

A capacidade de locomoção bacteriana mediada por flagelos foi avaliada de duas diferentes formas. O ensaio de motilidade *swarming* avaliou o movimento multicelular, enquanto que o ensaio de motilidade *swimming*, avaliou a capacidade de locomoção das células individuais em meio líquido (KEARNS, 2010).

Como demonstrado na Figura 17, houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para o ensaio de motilidade *swimming*, no qual a Xac WT obteve 87,96% de capacidade de locomoção individual em relação ao mutante, enquanto que multicelularmente, ambas apresentaram o mesmo padrão de locomoção.

Ainda é possível observar que, para ambas as cepas, a motilidade *swarming* foi mais bem sucedida do que a *swimming*. Há hipóteses de que este fato ocorre devido à força motriz exercida por várias células (*swarming*) ser maior que aquela exercida individualmente (*swimming*) (HANSMANN, 2016).

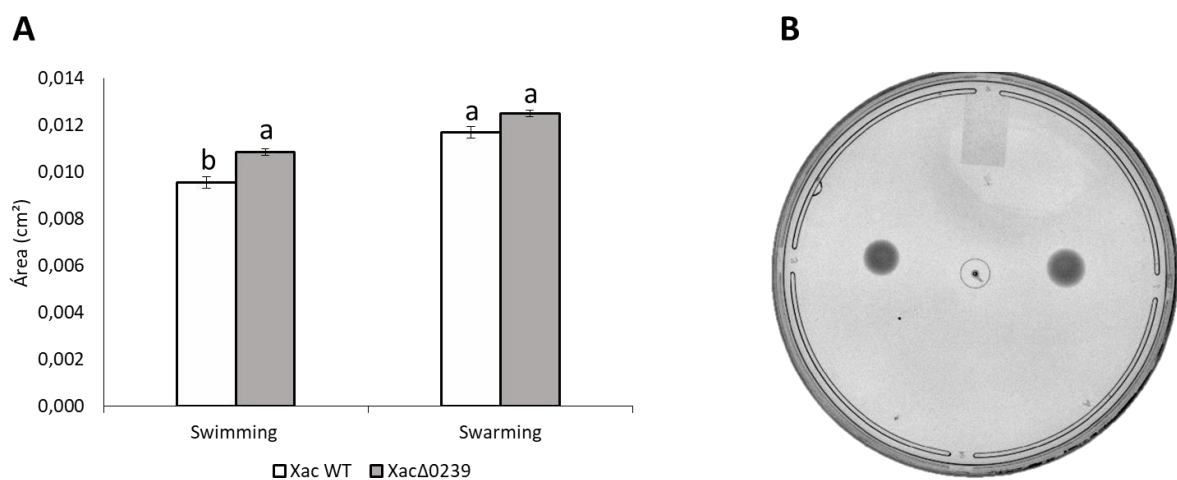


Figura 17. Análise da motilidade *swimming* e *swarming* da Xac WT (selvagem) e XacΔ0239 (mutante), demonstrando as áreas (cm²) de deslocamento das colônias (A). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), e as barras, o erro padrão das médias. Deslocamento das colônias formadas nos testes de motilidade (B).

5.6. Agregação bacteriana

O ensaio de agregação bacteriana não apresentou diferenças entre a *Xac* WT e a *Xac*Δ0239. Tal fato pode ser comprovado pelas aferições de densidade óptica (600nm) (Figura 18A), e visualizados na imagem (Figura 18B), na qual foram fotografados os tubos de borosilicato no T14 (24 horas após o início do experimento). Observa-se que o precipitado formado nos tubos de borosilicato foram parecidos para ambas as cepas, havendo persistência das células se manterem dispersas na solução.

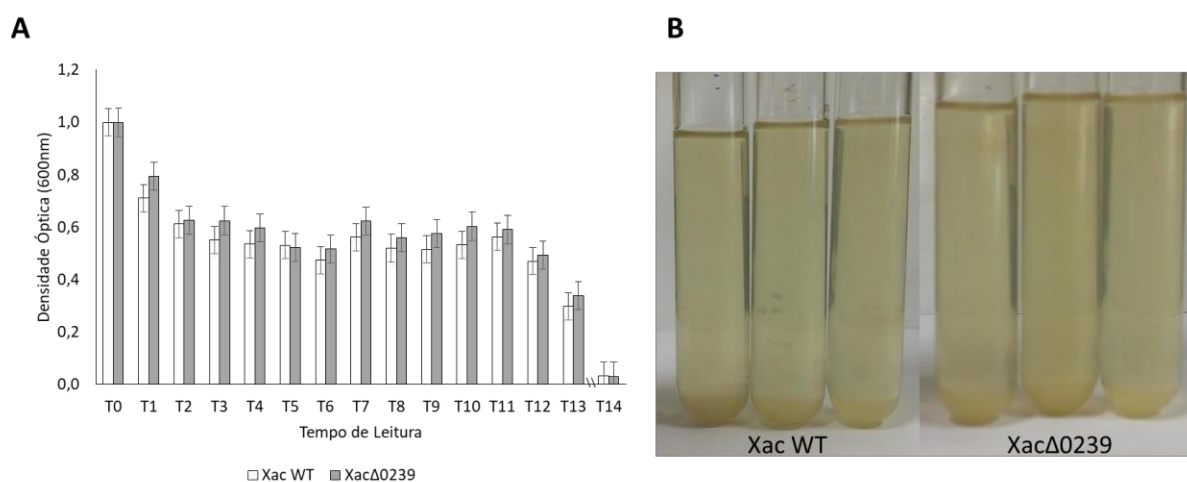


Figura 18. Ensaio de agregação bacteriana comparando-se a *Xac* WT (selvagem) e a *Xac*Δ0239 (mutante). (A) Gráfico com as médias das aferições de densidade óptica (600nm) por tempo de avaliação. (B) registro fotográfico comparando-se as suspensões bacterianas. As barras representam o erro padrão das médias.

5.7. Formação de biofilme bacteriano

Para avaliar o impacto da deleção da ORF XAC0239 na produção de exopolissacarídeos e, conseqüentemente, na capacidade de formação de biofilme bacteriano, foi realizado o ensaio de biofilme em dois meios de cultura: NB e XVM2 suplementado com glicose a 1%.

Como apresentado na Figura 19, a Xac WT produziu mais biofilme do que a Xac Δ 0239 em ambos os testes, sendo que os aumentos de produção foram estatisticamente diferentes em ambos os casos ($p < 0,05$).

Outro fato a ser observado é que as cepas foram capazes de produzir mais biofilme quando em meio XVM2 suplementado com glicose a 1% do que em meio NB. Este fato pode ser explicado por haver, no meio XVM2, maiores teores de açúcares, o que estimula a produção do composto.

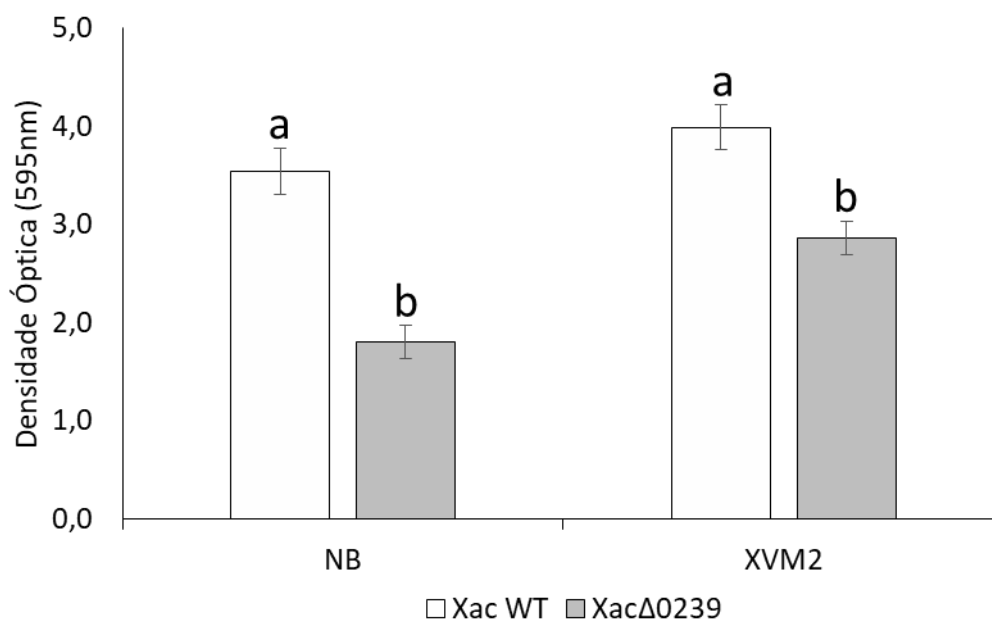


Figura 19. Ensaio de formação de biofilme em meio NB e XVM2 suplementado com glicose a 1%, comparando-se a Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). Os dados representam as médias dos valores de densidade óptica (595nm). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) e as barras, o erro padrão das médias.

5.8. Formação de goma xantana

O ensaio de formação de goma xantana não apresentou diferenças significativas para a Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). Este resultado indica que a quantidade de goma xantana produzida por células para cada uma das cepas é equivalente, apontando que a ORF XAC0239 não possui ação direta na formação do composto (Figura 20).

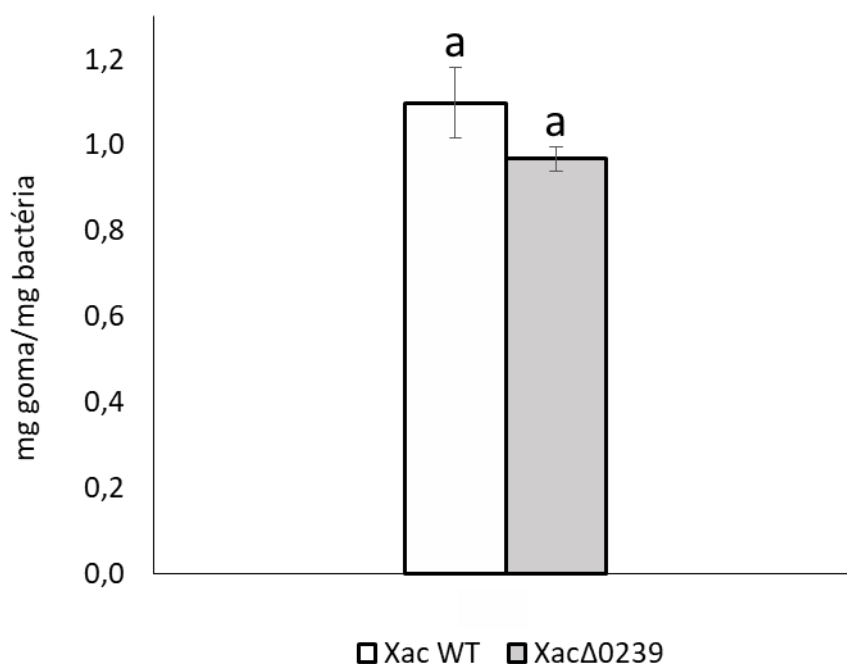


Figura 20. Formação de goma xantana pela Xac WT (selvagem) e a Xac Δ 0239 (mutante). Os valores representam as médias de quantidade de goma (mg) produzida por bactéria (mg). Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) e as barras, o erro padrão das médias.

5.9. Degradação de celulose

O teste de degradação de celulose demonstrou que o mutante Xac Δ 0239 é capaz de degradar mais celulose do que a Xac WT, como pode ser verificado no gráfico da Figura 21A, em que foram avaliados os diâmetros dos halos (H) formados, por colônia (C); e pela imagem apresentada na Figura 21B. Após a coloração com o corante Vermelho Congo a 1%, os halos evidenciados detectaram a região em torno das colônias onde houve hidrólise da celulose presente no meio de cultura.

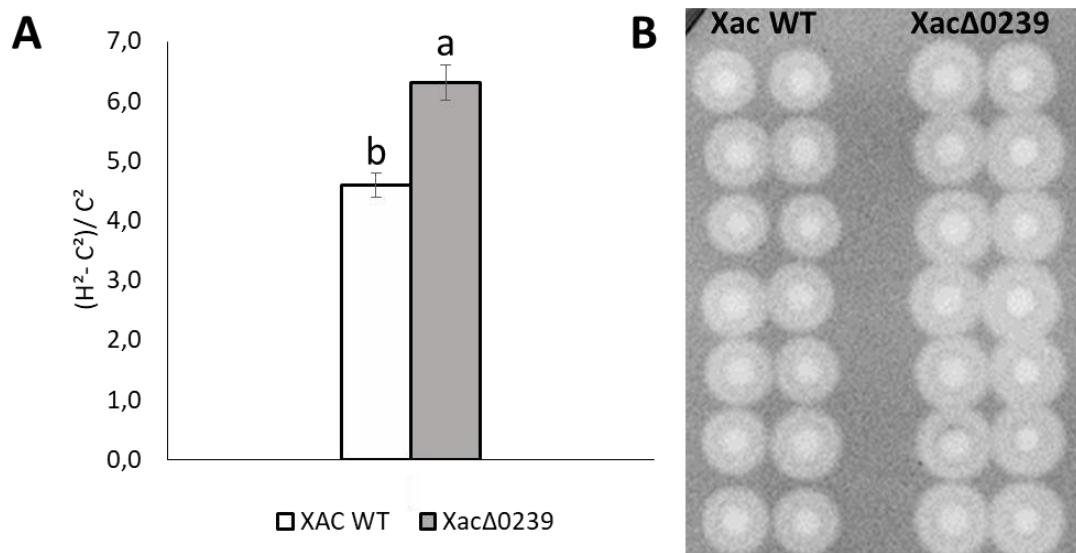


Figura 21. Degradação de celulose pela Xac WT (selvagem) e Xac Δ 0239 (mutante) avaliadas por meio da ação de CMCase (atividade de carboximetilcelulose). (A) valores médios das áreas degradadas pela celulase ao redor das colônias e, (B) colônias formadas em meio de cultura com CMC após a coloração com corante Vermelho Congo (1%). H: diâmetro do halo; C: diâmetro da colônia. Letras significam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$), e as barras, o erro padrão das médias.

5.10. Modelagem molecular

A análise de modelagem molecular foi processada por duas ferramentas destinadas a esta finalidade, PHYRE2 e I-TASSER, e ambas apresentaram resultados similares.

Os principais resultados para a ORF XAC0239 pela ferramenta PHYRE2 estão apresentados na Figura 22. Com uma alta confiança (90%, barra vermelha) foi predito que a estrutura secundária (SS, *Secondary Structure*) apresenta, em parte, uma dupla alfa hélice e, em parte, hélice transmembrana (ver legenda, Figura 22A). A predição para ser uma estrutura com dupla alfa hélice também pode ser observada pela Figura 22B. A Figura 22C apresenta a topologia da proteína ancorada na membrana dos aminoácidos 16 (N-terminal) a 46 (C-terminal), demonstrando novamente a predição para ser uma proteína transmembrana.

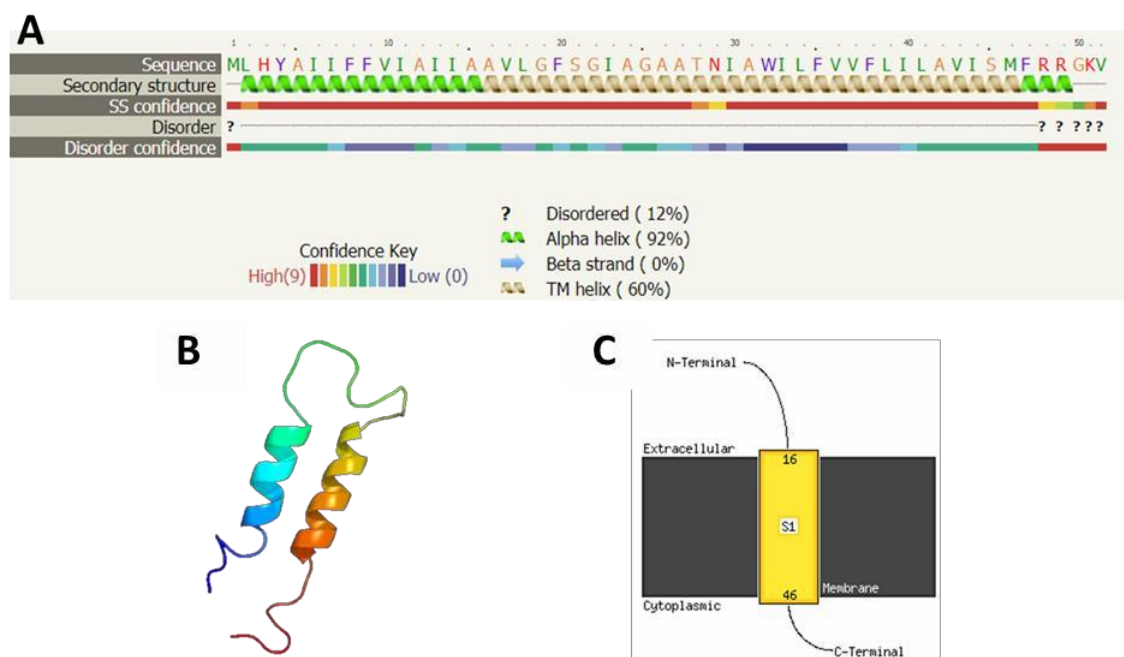


Figura 22. Resultados da modelagem molecular da proteína XAC0239 pela ferramenta PHYRE2. (A) Predição de estrutura secundária; (B) Modelo proteico final; (C) Visualização da topologia predita.

As principais conclusões que podem ser alcançadas por meio da ferramenta I-TASSER estão apresentadas na Figura 23. Semelhantemente ao identificado através da ferramenta anterior, é predita ter uma dupla hélice, por

ambas as análises: pela estrutura secundária (Figura 23A) e pelo modelo final gerado (Figura 23B).

A

	20	40
Sequence	MLHYAIIFFVIAIIAAVLGFSGIAGAATNIAWILFVFLILAVISMFRRGKV	
Prediction	CCCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCC	
Conf.Score	91024799999999999976440788887299999999999999999963779	

H:Helix; S:Strand; C:Coil

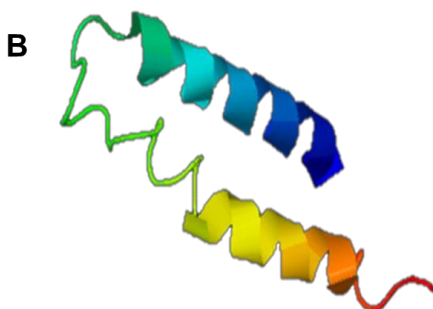


Figura 23. Resultado da modelagem molecular pela ferramenta I-TASSER. (A) Predição da estrutura secundária. (B) Modelo proteico final.

6. DISCUSSÃO

Para o melhor entendimento das interações entre planta e patógeno, é necessário que sejam descritas as funções dos genes utilizados nessa situação pelos organismos envolvidos. Referindo-se ao patógeno, o conhecimento de genes, principalmente aqueles relacionados ao reconhecimento e colonização na superfície hospedeira, lançamento de efetores e enzimas degradadoras e genes de defesa são pontos chave no entendimento dessas relações.

Muitos são os meios de pesquisa que proporcionam a identificação e a clareza do processamento desses genes alvo em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (*X. axonopodis* subsp. *citri* 306 - Xac). Dentre elas, o sequenciamento do genoma deste fitopatógeno (DA SILVA et al., 2002) abriu portas para estudos funcionais de genes utilizando diversas ferramentas de pesquisas como: mutações sítio-dirigidas (GUO et al., 2015) e randômicas (BAPTISTA et al., 2010), análises transcricionais (HU et al., 2016) e microarranjos (KOGENARU et al., 2012), modelagem molecular (BAHADUR; BASAK, 2014), edição genômica via *CRISPR* (PENG et al., 2017), entre outras.

Embora existam diversos grupos de pesquisa focados na identificação e estudos de genes de Xac relacionados a processos de interação com seus hospedeiros, sabe-se que uma grande quantidade de regiões preditas a codificarem proteínas (ORFs) ainda possuem funções desconhecidas (37,16%).

Neste caso, a união de ferramentas de análises moleculares proporciona o complemento dos conhecimentos já existentes. É o caso do presente trabalho, em que as informações obtidas por análises *in silico* (FINN 2016, 2017), mutação sítio-dirigida (LEE et al., 2004) e modelagem molecular (KELLEY et al., 2015; YANG et al., 2015), unidas aos dados disponíveis na literatura possibilitaram o princípio do entendimento da função gênica da ORF XAC0239, a qual, até então, é anotada como uma proteína hipotética.

Inicialmente, a análise do perfil transcricional do gene (Figura 6) permitiu deduzir que a ORF estudada apresenta influência no metabolismo da Xac durante a relação patógeno-hospedeiro. A superexpressão gênica demonstra que a bactéria necessitou ativar a proteína derivada da ORF XAC0239, pois precisava, momentaneamente, dos efeitos decorrentes dela.

Quando há o interesse em se fazer uma caracterização gênica, a estratégia de mutação sítio-dirigida é uma valiosa aliada (GUO et al., 2015; XIA et al., 2016). Dessa forma, foi escolhida a estratégia de mutação sítio-dirigida de PCR por sobreposição e extensão (LEE et al., 2004) com o intuito de se excluir a ORF XAC0239 do genoma de *Xac*, sendo possível verificar os efeitos fenotípicos e funcionais da falta desse gene, ou desta proteína codificada para a bactéria e, conseqüentemente, para a relação fitopatogênica.

A ORF XAC0239 possui 52 aminoácidos, é muito conservada em bactérias e apresenta um domínio de função desconhecida (DUF1328) envolvido com a membrana plasmática, de acordo com dados da ferramenta “InterProScan” (FINN et al., 2016, 2017). As escassas informações sobre essa ORF fizeram com que o estudo se baseasse em elementos conhecidos sobre o domínio proteico, homologias e os dados gerados experimentalmente.

Entre os 100 primeiros alinhamentos gerados pela ferramenta “BLASTn”, 38 seqüências mostraram-se idênticas à ORF XAC0239. As mesmas possuem o domínio DUF1328 e são genes codificantes para proteínas hipotéticas de *X. citri* subsp. *citri*, *X. citri* subsp. *malvacearum*, *X. citri* subsp. *glycines* e *X. axonopodis*. A análise pelo “BLASTp” indicou similaridade de acima 90% com 22 seqüências proteicas que possuem o domínio DUF1328 de *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas* e acima de 70% com outras Xanthomonadales.

De acordo com Luo e colaboradores (2015) os genes essenciais às bactérias são mais conservados que os não essenciais, isto porque os primeiros estão sujeitos a uma maior pressão seletiva, mostrando que a proteína tem um importante papel funcional ou estrutural para o organismo. No caso das seqüências nucleotídica e proteica da XAC0239, é possível observar que há um processo de conservação dessas seqüências em bactérias, inclusive Xanthomonadales, consolidando a importância desta ORF no genoma de *Xac*.

A possível importância funcional ou estrutural da proteína hipotética codificada pela ORF XAC0239 pode ser evidenciada pelos resultados obtidos com os testes de patogenicidade (Figuras 13 e 14) e de curva de crescimento *in vivo* na variedade laranja doce ‘Pera Rio’ (Figura 16), pois demonstram a diminuição na multiplicação da bactéria e conseqüentes sintomas de cancro cítrico. Em uma pesquisa com *Xac*, também visando identificação de função gênica, foram observadas claras diferenças sintomatológicas entre as cepas

selvagem e mutante, assim como diferenças no crescimento bacteriano *in vivo* a partir do terceiro dia após a inoculação, reportando que o gene *xpsD* mutado atua na degradação da celulose e, com isso, na virulência da bactéria (BAPTISTA et al., 2010).

Laia et al. (2009), analisando uma biblioteca de mutantes gerados por inserção aleatória de transposons, observaram alteração na virulência de 44 mutantes, sendo que oito apresentaram perda total dos sintomas de cancro cítrico e alguns desses mutantes revelaram ORFs hipotéticas relacionadas à virulência da *X. citri* subsp. *citri*. Em outras pesquisas semelhantes, mutantes de *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Acinetobacter baumannii* para genes relacionados a proteínas de membrana apresentaram-se menos invasivos às células hospedeiras que as cepas selvagens (AZGHANI et al., 2002; CHOI et al., 2008; HSIEH et al., 2013; KHAN et al., 2003).

A redução de sintomas, bem como a diminuição do crescimento bacteriano *in vivo*, pode ser relacionada com a provável funcionalidade da ORF XAC0239 como proteína de membrana, visto que as análises na ferramenta “CDD” (Figura 7A) e ambas as modelagens moleculares (Figuras 22 e 23) feitas para esta proteína demonstraram essa compatibilidade.

As proteínas de membrana apresentam uma crítica função celular envolvendo vias de metabolismo básico de bactérias como geração de energia, resposta a alterações ambientais, transporte de nutrientes, defesa, entre outros (GOODACRE et al., 2014).

Em uma investigação sobre o papel da proteína externa da membrana OprB em *X. citri* subsp. *citri*, na formação de biofilme e sua importância na virulência bacteriana, Ficarra et al. (2017) concluíram que a proteína é essencial na formação de biofilme, aderência ao tecido hospedeiro, sobrevivência epifítica e transporte de glicose, passos cruciais para a sobrevivência do patógeno. Resultados semelhantes foram demonstrados por Chen e colaboradores (2017) por meio de mutação no gene *mopB*, codificador de uma proteína de membrana de *Xylella fastidiosa*.

Pela mesma perspectiva dos autores acima citados, é possível correlacionar a proteína estudada com a diminuição da produção de biofilme em dois meios de cultura (Figura 19) e com a diminuição da patogenicidade do mutante. Assim, deduz-se, inicialmente, que a mutação em uma possível

proteína de membrana (ORF XAC0239) está correlacionada diretamente à formação de exopolissacarídeos e o desenvolvimento do patógeno no hospedeiro.

O DUF1328, domínio presente na ORF XAC0239, possui uma ampla distribuição nos organismos, principalmente em bactérias (FINN et al., 2016). Uma vez que esse domínio possui homólogos em diversos organismos é possível analisar demais funções, vias metabólicas e reguladores relacionados a ele. Um exemplo é o caso do STM14_5481, gene de *Salmonella enterica*, estudado por Lago et al. (2017), que é homólogo ao *ytjA* de *E. coli*. Ambos possuem o domínio DUF1328 e, no estudo citado, foram validadas as expressões e regulações pelo fator σ^S de 20 pequenas proteínas (de 27 a 96 aminoácidos) não caracterizadas. O STM14_5481 foi caracterizado como altamente controlado pelo fator σ^S , ou também conhecido RpoS, na fase estacionária.

Os fatores sigma (σ) são um grupo de proteínas que se ligam a uma subunidade da RNA polimerase de procariotos. Quando ocorre essa associação são desencadeados mecanismos de respostas celulares através da redireção da transcrição. Estes fatores provêm artifícios para regular simultaneamente um grande número de genes de procariotos, em resposta a um estímulo ambiental particular (KAZMIERCZAK et al., 2005).

Em *Xanthomonas*, o fator mais conhecido que controla as respostas a estresse é o fator σ^N , RpoN, ou ainda σ^{54} (KAZMIERCZAK et al., 2005). O RpoN tem sido relacionado a muitas bactérias uniflagelares, regulando, entre outras funções, a sua motilidade (DOND; MEKALANOS, 2012). Para avaliar o comportamento de mutantes para os genes *rpoN* em *X. citri* subsp. *citri*, foram construídos três mutantes ($\Delta rpoN1$, $\Delta rpoN2$ e $\Delta rpoN1N2$) e analisados fenotipicamente quanto a patogenicidade, motilidade e utilização de substratos. Para o teste de patogenicidade a 10^6 UFC.mL⁻¹ os três mutantes atrasaram os sintomas de cancro cítrico e os sinais de encharcamento começaram a aparecer ao 5º dia após a inoculação (GICHARU et al., 2016). Tais resultados corroboram com os obtidos no presente estudo para o mutante Xac Δ 0239. O mesmo trabalho revalida nossos resultados referentes ao desenvolvimento bacteriano *in vivo*, sendo que o mutante se multiplicou em uma taxa menor do que a cepa selvagem (Figura 16).

Embora o exato papel do fator σ^{54} não tenha sido experimentalmente confirmado, a correlação feita entre os genes *rpoN* não são limitados apenas à multiplicação das células bacterianas no hospedeiro. No trabalho supracitado é afirmado que o *rpoN1* regula positivamente a expressão de genes flagelares, enquanto que o *rpoN2* os regula negativamente. Esta conclusão foi alcançada a partir dos efeitos das mutações nos ensaios de motilidade *swimming* e *swarming*, nos quais o $\Delta RpoN1$ reduziu e o $\Delta RpoN2$ aumentou ambos os movimentos dependentes de flagelo (GICHARU et al., 2016).

Em um trabalho similar, Tian e colaboradores (2015), obtiveram, a partir de observações com mutantes para o *RpoN2* e genes flagelares, que a motilidade não contribui diretamente para a virulência de *X. oryzae* subsp. *oryzae* (Xoo) e que o *RpoN* regula, de maneira independente ambos, a virulência de Xoo e a expressão de genes flagelares. No genoma da Xac há duas cópias do *RpoN*, *Xac1969* e *Xac2972*, entretanto, as suas funções não são redundantes, sugerindo que há especialização de genes RpoN durante a evolução (GICHARU et al., 2016; POGGIO et al., 2002; TIAN et al., 2015). Isso demonstra que são necessários estudos em *X. citri* subsp. *citri* que determinem os mecanismos de ambos os genes RpoN na patogenicidade.

Respaldados pelas afirmações dos trabalhos mencionados e pelos resultados obtidos por meio do mutante *Xac* Δ 0239, é possível verificar que a mutação não alterou fenotipicamente a motilidade tipo *swarming*, entretanto, para a motilidade *swimming* a mutação revelou sua regulação negativa, fato observado pelo aumento do halo de crescimento do mutante em relação ao selvagem.

Alguns estudos do fator sigma, em outros organismos, revelaram que o RpoS, além de controlar positivamente genes relacionados à motilidade e à formação de biofilme (KULESUS et al., 2008), é capaz de controlar negativamente a produção de enzimas extracelulares como pectato liases, poligalacturonases e celulasas, as quais são importantes para a degradação da parede celular dos hospedeiros e, conseqüentemente, para a infecção (MATTINEN et al., 2004; MUKHERJEE et al., 1998). Embora não seja possível identificar a função da proteína derivada da ORF XAC0239, a análise de degradação de celulose pelo teste de CMCCase é um indício de que esta possa estar envolvida com as enzimas secretadas pelo T2SS e degradadoras da

parede celular hospedeira. Xia *et al.* (2016) verificaram que a deleção de uma endoglucanase extracelular de *X. citri* subsp. *citri* resultou na perda de sintomas de cancro cítrico, demonstrando que a proteína envolvida na secreção do T2SS está diretamente envolvida com a infecção.

Assim, a partir dos resultados dos testes de patogenicidade, curvas de crescimento *in vivo*, formação de biofilme, motilidades *swimming* e *swarming* e de CMCase é inferido que algum fator sigma, seja ele RpoS, RpoN, ou outro ainda desconhecido, possa estar mediando a ação da proteína derivada da ORF XAC0239.

Em análise de alinhamento pela ferramenta “BLASTp” das sequências da ORF XAC0239 e do gene *ytjA* de *E. coli*, anteriormente citado, é encontrada similaridade de 71% entre as sequências, e esta similaridade se dá entre os aminoácidos 16 a 47, região a qual está ancorada na membrana plasmática, segundo a modelagem molecular feita pela ferramenta PHYRE2 (Figura 22C).

No presente estudo, sugere-se que algum fator sigma, possivelmente o RpoN, esteja regulando direta ou indiretamente o gene *Xac0239*, afetando negativamente a motilidade *swimming* e a ação de celulasas e positivamente a produção de biofilme e, desta forma, diminuindo a multiplicação e sobrevivência da bactéria *in planta*. Sabendo-se que a mutação da ORF XAC0239 diminuiu a produção de biofilme e a virulência, mas aumentou a produção e/ou ação de celulasas, é possível pressupor que demais genes relacionados a enzimas degradadoras da parede celular estejam sendo superexpressos, entretanto é necessário que haja maiores esclarecimentos deste cenário e quais genes estariam sendo responsáveis pelas cascatas e regulações gênicas. A partir dessas conclusões é proposto um modelo simplificado (Figura 24).

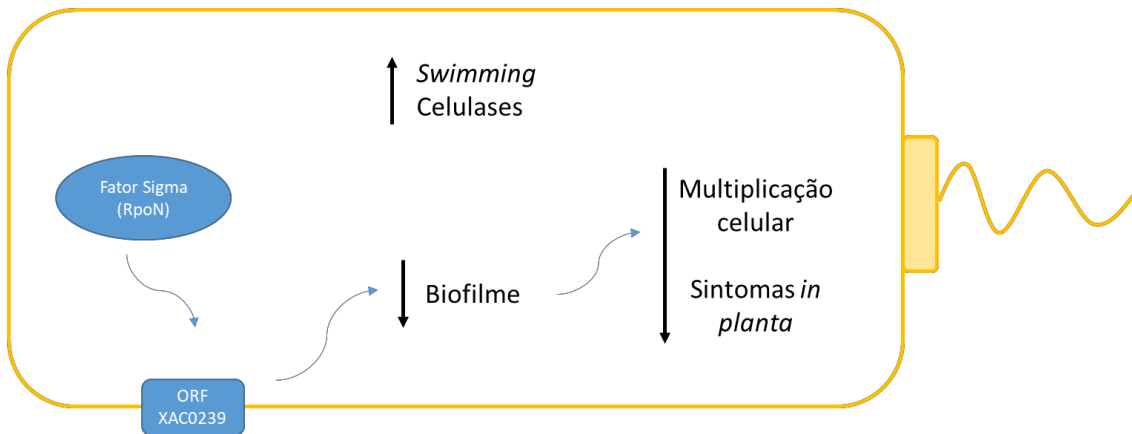


Figura 24. Modelo simples proposto para identificação da provável função da ORF XAC0239. A ausência do produto proteico dessa ORF acarretou na redução da formação do biofilme bacteriano, o qual está diretamente relacionado com a capacidade de multiplicação celular e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da doença. Ainda, de maneira compensatória, a bactéria pode estar superexpressando genes relacionados à motilidade tipo *swimming* e degradação de parede celular.

7. CONCLUSÕES

O produto proteico da ORF XAC0239 possui relação direta ou indireta no processo de patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em citros, uma vez que:

O gene XAC0239 está altamente expresso nos processos de infecção iniciais de Xac 306 nas variedades 'Kumquat' (*Fortunella* spp.) e 'Pera-Rio' (*C. sinensis*);

A mutação do gene *Xac0239* afeta a multiplicação celular da Xac 306 e produção dos sintomas de cancro cítrico em laranja doce 'Pera Rio' e lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia*);

O gene *Xac0239* atua na formação de biofilme, visto que, em sua ausência, foi reduzida sua produção em meio de cultura XVM2 e NB;

O gene *Xac0239* pode ter relação com a motilidade tipo *swimming*, dado que o mutante Δ Xac0239 apresentou um aumento nessa movimentação;

Na carência de colonizar a superfície do hospedeiro via formação de biofilme, a bactéria pode ter tentando, de maneira alternativa, infectar o hospedeiro por meio do aumento da degradação de celulose;

A proteína XAC0239 está ancorada na membrana plasmática e seu gene é regulado por um fator sigma, o qual possui ação diretamente relacionada a respostas de estresse, como condições infectantes.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. Transcriptome: connecting the genome to gene function. **Nat Educ**, v. 1, n. 1, p. 195, 2008.
- AMARAL, A. M.; CARVALHO, S. A.; SILVA, L. F. C.; MACHADO, M. A. Reaction of genotypes of Citrus species and varieties to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under greenhouse conditions. **Journal of Plant Pathology**, p. 519-524, 2010.
- ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.; CARVALHO, S. A.; MACHADO, M. A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 3, p. 1201-1205, 2005.
- AZGHANI, A. O.; IDELL, S.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. **Microbial Pathogenesis**, v. 33, n. 3, p. 109-114, 2002.
- BAHADUR, R. P.; BASAK, J. Molecular modeling of protein–protein interaction to decipher the structural mechanism of nonhost resistance in rice. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 32, n. 4, p. 669-681, 2014.
- BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A.; HOMEEM, R. A.; TORRES, P. S.; VOJNOV, A. A.; AMARAL, A. M. D. Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 146-153, 2010.
- BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W. **Experimentação Agronômica & AgroEstat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. 1. ed. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 2015. p. 247-278.
- BATEMAN, A.; COGGILL, P.; FINN, R. D. DUFs: families in search of function. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 66, n. 10, p. 1148-1152, 2010.
- BEHLAU, F.; BARELLI, N. L.; BELASQUE JR, J. Lessons from a case of successful eradication of citrus canker in a citrus-producing farm in São Paulo State, Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 96, n. 3, p. 561-568, 2014.
- BEHLAU, F.; BELASQUE JR, J. Cancro cítrico: a doença e seu controle. **Fundecitrus, Araraquara, Brasil**, 2014.
- BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, n. 10, 1957.
- BORATYN, G. M.; CAMACHO, C.; COOPER, P. S.; COULOURIS, G.; FONG, A.; MA, N.; MADDEN, T. L.; MCGINNIS, S. D.; MEREZHUK, Y.; et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W29-W33, 2013.

BORUKHOV, S; NUDLER, E. RNA polymerase holoenzyme: structure, function and biological implications. **Current opinion in microbiology**, v. 6, n. 2, p. 93-100, 2003.

BOYD, L. A.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D. M.; LEACH, J. E.; LEUNG, H. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 233-240, 2013.

BRASIL. Instrução Normativa nº 37, 5 de setembro de 2016. Estabelece procedimentos a serem adotados no Estado de São Paulo visando a supressão/erradicação da praga denominada cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF. 2016.

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

CAPPELLETTI, P. A. **Identificação e análise funcional de interações proteína-proteína do sistema de secreção do tipo III do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CAVALLINI, J. S. **Expressão gênica diferencial de laranja pêra rio (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e lima ácida “galego” (*Citrus aurantifolia* Swingle) em resposta à infecção por *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

CHATTERJEE, A.; CUI, Y.; LIU, Y.; DUMENYO, C. K.; CHATTERJEE, A. K. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1959-1967, 1995.

CHEN, H.; KANDEL, P. P.; CRUZ, L. F.; COBINE, P. A.; DE LA FUENTE, L. The Major Outer Membrane Protein MopB Is Required for Twitching Movement and Affects Biofilm Formation and Virulence in Two *Xylella fastidiosa* strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 30, n. 11, p. 896-905, 2017.

CHEN, Y. Y.; WU, C. H.; LIN, J. W.; WENG, S. F.; TSENG, Y. H. Mutation of the gene encoding a major outer-membrane protein in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causes pleiotropic effects, including loss of pathogenicity. **Microbiology**, v. 156, n. 9, p. 2842-2854, 2010.

CHOI, C. H.; LEE, J. S.; LEE, Y. C.; PARK, T. I.; LEE, J. C. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 216, 2008.

CIVEROLO, E. L. Bacterial canker disease of citrus [*Xanthomonas campestris*]. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, 1984.

CLAYTON, S. R.; HEURILIER, K.; OSHIMA, T.; HOBMAN, J. L. Copper and zinc stress in bacteria. In: KIDD, S. P. **Stress response in Pathogenic Bacteria**. Adelaide, CABI, 2011. cap. 11. ISBN: 9781845937607.

COBINE, P. A.; CRUZ, L. F.; NAVARRETE, F.; DUNCAN, D.; TYGART, M.; DE LA FUENTE, L. *Xylella fastidiosa* differentially accumulates mineral elements in biofilm and planktonic cells. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54936, 2013.

COFRE, T. C. G. **Transcriptoma (RNA-seq) de laranja doce Valência (*Citrus sinensis* L. Osbeck) e Kumquat (*Fortunella* spp.) infectadas por *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

DA SILVA, A. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459, 2002.

DE OLIVEIRA, R. P.; SOARES FILHO, W. D. S.; MACHADO, M. A.; FERREIRA, E. A.; SCIVITTARO, W. B.; GESTEIRA, A. D. S. Melhoramento genético de plantas cítricas. **Embrapa Clima Temperado**. 2014.

DONG, T. G.; MEKALANOS, J. J. Characterization of the RpoN regulon reveals differential regulation of T6SS and new flagellar operons in *Vibrio cholerae* O37 strain V52. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 16, p. 7766-7775, 2012.

DONG, T.; SCHELLHORN, H. E. Role of RpoS in virulence of pathogens. **Infection and immunity**, v. 78, n. 3, p. 887-897, 2010.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE JR, J. Doenças dos citros. **Manual de Fitopatologia**, v. 2, p. 239-269, 2005.

ERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; & JONES, J. B. Recent Advances in Understanding *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Pathogenesis and Citrus Canker Disease Management. **Molecular Plant Pathology**, 2017.

FINN, R. D.; ATTWOOD, T. K.; BABBITT, P. C.; BATEMAN, A.; BORK, P.; BRIDGE, A. J.; CHANG, H. Y.; DOSZTÁNYI, Z.; EL-GEBALI, S.; GOUGH, M. F. J.; et al. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D190-D199, 2016.

FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; MISTRY, J.; MITCHELL, A. L.; POTTER, S. C.; PUNTA, M.; QURESHI, M.; SALAZAR, G. A.; et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D279-D285, 2015.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. Doenças e Pragas. 2018. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>. Acesso em: 21 mar. 2018a.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. Levantamentos. 2017. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/levantamento-doencas-2017.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2018b.

GATI, C.; STETSENKO, A.; SLOTBOOM, D. J.; SCHERES, S. H.; GUSKOV, A. The structural basis of proton driven zinc transport by ZntB. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1313, 2017.

GICHARU, G. K.; SUN, D. L.; XUN, H. U.; FAN, X. J.; TAO, Z. H. U. O.; WU, C. W.; ZOU, H. S. The sigma 54 genes rpoN1 and rpoN2 of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* play different roles in virulence, nutrient utilization and cell motility. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 9, p. 2032-2039, 2016.

GOODACRE, N. F.; GERLOFF, D. L.; UETZ, P. Protein domains of unknown function are essential in bacteria. **MBio**, v. 5, n. 1, p. e00744-13, 2014.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. Citrus canker. **The Plant Health Instructor**. 2000.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 10, p. 32, 2002.

GUO, Y.; FIGUEIREDO, F.; JONES, J.; WANG, N. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 6, p. 649-661, 2011.

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

GUZZO, C. R.; SALINAS, R. K.; ANDRADE, M. O.; FARAH, C. S. PILZ protein structure and interactions with PILB and the FIMX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, n. 4, p. 848-866, 2009.

HANSMANN, D.; FIER, G.; BUCETA, R. C. New Insights into the Dynamics of Swarming Bacteria: A Theoretical Study. **arXiv preprint arXiv:1612.06267**, 2016.

HERZBERG, M., BAUER, L., KIRSTEN, A.; NIES, D. H. Interplay between seven secondary metal uptake systems is required for full metal resistance of *Cupriavidus metallidurans*. **Metallomics**, v. 8, n. 3, p. 313-326, 2016.

HSIEH, P. F.; LIU, J. Y.; PAN, Y. J.; WU, M. C.; LIN, T. L.; HUANG, Y. T.; WANG, J. T. *Klebsiella pneumoniae* peptidoglycan-associated lipoprotein and murein lipoprotein contribute to serum resistance, antiphagocytosis, and proinflammatory cytokine stimulation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 208, n. 10, p. 1580-1589, 2013.

HU, Y.; DUAN, S.; ZHANG, Y.; SHANTHARAJ, D.; JONES, J. B.; WANG, N. Temporal transcription profiling of sweet orange in response to PthA4-mediated *Xanthomonas citri* subsp. *citri* infection. **Phytopathology**, v. 106, n. 5, p. 442-451, 2016.

HYUN, Y.; KIM, J.; CHO, S. W.; CHOI, Y.; KIM, J. S.; COUPLAND, G. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. **Planta**, v. 241, n. 1, p. 271-284, 2015.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Levantamento sistemático da produção agrícola – Estatística da Produção Agrícola. 2018.

JACIANI, F. J.; DESTÉFANO, S. A. L.; NETO, J. R.; BELASQUE JR, J. Detection of a new bacterium related to *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* infecting Swingle citrumelo in Brazil. **Plant Disease**, v. 93, n. 10, p. 1074-1074, 2009.

JALAN, N.; KUMAR, D.; ANDRADE, M. O.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 551, 2013.

JALAN, N.; YAN, Q.; KOGENARU, S.; GUO, Y.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WANG, N. Genomics of *Xanthomonas citri* and Related Species. In: **Genomics of Plant-Associated Bacteria**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 151-176, 2014.

JING, G.; XUE, S.; ZOU, L. F.; ZOU, H. S.; CHEN, G. Y. The small and large subunits of carbamoyl-phosphate synthase exhibit diverse contributions to pathogenicity in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 7, p. 1338-1347, 2015.

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

KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 527-543, 2005.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634, 2010.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S. YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845, 2015.

KHAN, N. A.; SHIN, S.; CHUNG, J. W.; KIM, K. J.; ELLIOTT, S., WANG, Y.; KIM, K. S. Outer membrane protein A and cytotoxic necrotizing factor-1 use diverse signaling mechanisms for *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 35, n. 1, p. 35-42, 2003.

KOGENARU, S.; QING, Y.; GUO, Y.; WANG, N. RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 629, 2012.

KULESUS, R. R.; DIAZ-PEREZ, K.; SLECHTA, E. S.; ETO, D. S.; MULVEY, M. A. Impact of the RNA chaperone Hfq on the fitness and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3019-3026, 2008.

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

LAGO M.; MONTEIL V.; DOUCHE T.; GUGLIELMINI J.; CRISCUOLO A.; MAUFRAIS C.; MATONDO M.; NOREL F. Proteome remodelling by the stress sigma factor RpoS/ σ^S in *Salmonella*: identification of small proteins and evidence for post-transcriptional regulation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2127, 2017.

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

LEE, B. M.; PARK, Y. J.; PARK, D. S.; KANG, H. W.; KIM, J. G.; SONG, E. S.; PARK, I. C.; YOON, U. H.; HAHN, J. H.; KOO, B. S.; et al. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 2, p. 577-586, 2005.

LEE, J.; LEE, H. J.; SHIN, M. K.; RYU, W. S. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. **Biotechniques**, v. 36, n. 3, p. 398-401, 2004.

LEE, M. C.; WENG, S. F.; TSENG, Y. Flagellin gene *fliC* of *Xanthomonas campestris* is upregulated by transcription factor Clp. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 307, n. 3, p. 647-652, 2003.

LEITE JÚNIOR, R. P. Cancro cítrico: prevenção e controle no Paraná (Circular nº 61). Londrina: IAPAR, 51 p. 1990.

LIU, H.; DONG, C.; ZHAO, T.; HAN, J.; WANG, T.; WEN, X.; HUANG, Q. Functional analysis of the ferric uptake regulator gene *fur* in *Xanthomonas vesicatoria*. **PloS One**, v. 11, n. 2, p. e0149280, 2016.

LUO, H.; GAO, F.; LIN, Y. Evolutionary conservation analysis between the essential and nonessential genes in bacterial genomes. **Scientific Reports**, v. 5, p. 13210, 2015.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, R.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; VOJNOV, A. A. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 819-829, 2011.

MARCHLER-BAUER, A.; BO, Y.; HAN, L.; HE, J.; LANCZYCKI, C. J.; LU, S.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D200-D203, 2016.

MARTINELLI, F.; URATSU, S. L.; ALBRECHT, U.; REAGAN, R. L.; PHU, M. L.; BRITTON, M.; BUFFALO, V.; FASS, J.; LEICHT, E.; ZHAO, W.; et al. Transcriptome profiling of citrus fruit response to huanglongbing disease. **PloS One**, v. 7, n. 5, p. e38039, 2012.

MATTINEN, L.; TSHUIKINA, M.; MÄE, A.; Pirhonen, M. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 12, p. 1366-1375, 2004.

MATTOS JUNIOR, D. D.; NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. D.; POMPEU JUNIOR, J. **CITROS: principais informações e recomendações de cultivo**, 2005.

MUKHERJEE, A.; CUI, Y.; MA, W.; LIU, Y.; ISHIHAMA, A.; EISENSTARK, A.; CHATTERJEE, A. K. RpoS (sigma-S) controls expression of *rsmA*, a global regulator of secondary metabolites, harpin, and extracellular proteins in *Erwinia carotovora*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 14, p. 3629-3634, 1998.

MURATA, M. M. **Transcriptoma da interação de tangerina Satsuma (*Citrus unshiu*) e laranja doce Hamlin (*Citrus sinensis*) infectadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2. ed. Porto Alegre. 2014.

NEVES, M. F.; JANK, M. S. Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda 2015. **Pensa Boletim Online, São Paulo**, 2006.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. **Ribeirão Preto: CitrusBR**, 2010.

PENG, A.; CHEN, S.; LEI, T.; XU, L.; HE, Y.; WU, L.; YAO, L.; ZOU, X. Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, n. 12, p. 1509-1519, 2017.

PERON, G. C. **Identificação de genes de resistência a *Xanthomonas citri* subsp *citri*, agente causal do cancro cítrico**. 2014. Monografia (Graduação em Agronomia) – Faculdades de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. . SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785, 2011.

QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S. X.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; LU, L. F.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D. J.; TANG, H.; et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, v. 15, n. 6, p. 757-767, 2005.

RANI, T. S.; TAKAHASHI, D.; UEMURA, M.; PODILE, A. R.; et al. Proteins associated with oxidative burst and cell wall strengthening accumulate during citrus-*Xanthomonas* non-host interaction. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 5, p. 1349-1360, 2015.

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

ROMEIRO, R. D. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Universidade Federal de Viçosa, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring harbor laboratory press, 1989.

SCHUBERT, T. S.; SUN, X. Bacterial citrus canker. (Fifth revision) Florida Department of Agriculture & Conservancy Services. **Plant Pathology Circular**. v.377, 2003.

SHINGLER, V. Signal sensing by σ^{54} -dependent regulators: derepression as a control mechanism. **Molecular microbiology**, v. 19, n. 3, p. 409-416, 1996.

SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, 1979.

SPIRIDONOV, N. A.; WILSON, D. B. A *celR* mutation affecting transcription of cellulase genes in *Thermobifida fusca*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 1, p. 252-255, 2000.

SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J. H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N. T.; ROTH, A.; BORK, P.; et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, p. gkw937, 2016.

TANG, D. J.; LI, X. J.; HE, Y. Q.; FENG, J. X.; CHEN, B.; TANG, J. L. The zinc uptake regulator Zur is essential for the full virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 18, n. 7, p. 652-658, 2005.

TAZIMA, Z. H.; AULER, P. A. M.; NEVES, C. S. V. J.; YADA, I. F. U.; LEITE JÚNIOR, R. P. Comportamento de clones de laranja 'Valência' na região norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 4, p. 970-974, 2008.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C.; BOCH, J.; BÜTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, A.; KAY, S.; et al. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 21, p. 7254-7266, 2005.

TIAN, F.; YU, C.; LI, H.; WU, X.; LI, B.; CHEN, H.; WU, M.; HE, C. Alternative sigma factor RpoN2 is required for flagellar motility and full virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Microbiological research**, v. 170, p. 177-183, 2015.

UNIPROT CONSORTIUM et al. UniProt: the universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 5, p. 2699, 2018.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Citrus: World Markets and Trade. 2018. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em: 06 fev, 2018.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57, 2009.

WOLF, J. B. W. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 4, p. 559-572, 2013.

WORLOCK, A. J.; SMITH, R. L. ZntB is a novel Zn²⁺ transporter in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4369-4373, 2002.

WU, H.; YU, X.; CHEN, L.; WU, G. Cloning, overexpression and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermus thermophilus* HB27. **Protein expression and purification**, v. 95, p. 22-27, 2014.

XIA, T.; LI, Y.; SUN, D.; ZHUO, T.; FAN, X.; ZOU, H. Correction: Identification of an Extracellular Endoglucanase That Is Required for Full Virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0156458, 2016.

XU, Q.; CHEN, L. L.; RUAN, X.; CHEN, D.; ZHU, A.; CHEN, C.; BERTRAND, D.; JIAO, W. B.; HAO, B. H.; LYON, M. P.; et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). **Nature Genetics**, v. 45, n. 1, p. 59, 2013.

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

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

YANG, J.; YAN, R.; ROY, A.; XU, D.; POISSON, J.; ZHANG, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 7, 2015.

YANG, T. C.; LEU, Y. W.; CHANG-CHIEN, H. C.; HU, R. M. Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FliH, FliB, and FlgM. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2266-2275, 2009.