



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



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

Estudo da inter-relação entre divisão celular, motilidade e fitopatogenicidade
em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

KENNY UMINO SATO

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

Março - 2019

KENNY UMINO SATO

Estudo da inter-relação entre divisão celular, motilidade e fitopatogenicidade em

Xanthomonas citri subsp. *citri*

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

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira

Rio Claro

2019

S253e Sato, Kenny Umino
Estudo da inter-relação entre divisão celular,
motilidade e fitopatogenicidade em *Xanthomonas*
citri subsp. *citri* / Kenny Umino Sato. -- Rio Claro,
2019
60 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Henrique Ferreira
Coorientadora: Leandro Márcio Moreira

1. Cancro cítrico. 2. XAC1934. 3. FleN. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da inter-relação entre divisão celular, motilidade e fitopatogenicidade em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

AUTOR: KENNY UMINO SATO

ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

COORIENTADOR: LEANDRO MÁRCIO MOREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Prof. Dra. ALESSANDRA ALVES DE SOUZA
Departamento de Biotecnologia / Instituto Agrônomo de Campinas

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Rio Claro, 25 de fevereiro de 2019

Dedico este trabalho à Deus, aos meus pais, familiares e amigos por todo o apoio e orientação até este momento.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a possibilidade de chegar até o presente momento de realização deste trabalho com o privilégio de aprender com pessoas muito capacitadas e amigas.

Ao **Prof. Dr. Henrique Ferreira** pela dedicada orientação, confiança, empenho e amizade para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao **Prof. Dr. Leandro Márcio Moreira** pela atenciosa coorientação sempre estando muito presente, tendo muita paciência e pela amizade.

À **Dra. Paula Maria Moreira Martins** pela amizade e aconselhamento sempre muito detalhado e preciso.

Ao **Prof. Dr. José Silvio Govone** pelo auxílio na parte de bioestatística deste trabalho.

Ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - processo nº 130340/2017-0) pelo apoio financeiro deste trabalho, proporcionando os requisitos necessários para seu desenvolvimento.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia por garantir o correto funcionamento das instalações e dependências do laboratório.

Ao Sr.(a) Relator(a) deste projeto pelas sugestões e críticas para o correto desenvolvimento deste trabalho.

À toda minha família que sempre me apoia e auxilia para que eu alcance meus objetivos e cresça cada vez mais sempre pensando no próximo.

E a todos meus amigos pelo companheirismo e momentos de risos importantíssimos na minha caminhada.

Obrigado!

“Don’t only practice your art, but force your way into its secrets, for it and knowledge can raise men to the divine.”

(Ludwig van Beethoven)

RESUMO

O cancro cítrico é uma doença que afeta todas as variedades economicamente importantes de citros cultivadas ao redor do mundo. Atualmente representa uma ameaça aos maiores produtores mundiais de laranjas doce e de suco concentrado: o estado de São Paulo, Brasil, e estado da Flórida, EUA. O agente etiológico mais importante do cancro é a bactéria Gram-negativa *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) patotipo A, cujo genoma tem sido estudado e impulsionado descobertas e avanços na compreensão da doença e de seu agente causador. Contudo, mecanismos celulares essenciais são ainda pouco explorados neste micro-organismo. Desta forma, a compreensão de tais mecanismos e de seus efetores pode ser explorado no desenvolvimento de antimicrobianos e de novas estratégias para o combate ao cancro cítrico. Nosso grupo mostrou recentemente que ésteres de ácido gálico são potentes inibidores da divisão cromossômica e celular em *X. citri*. No presente trabalho, demos continuidade aos estudos com o objetivo de caracterizar processos essenciais à infecção ocasionada por *X. citri*, como a motilidade. As análises de bioinformática revelaram que a ORF XAC1934 estaria relacionada com motilidade em *X. citri*, uma vez que há uma grande identidade desta ORF com *fleN*, um gene regulador da formação flagelar em outros micro-organismos. Os resultados de motilidade e potencial infectivo *in planta* do mutante deletado desta ORF corroboraram a literatura, apresentando padrões semelhantes a estudos com mutantes de *fleN* de *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae*. Apesar disso, não houve localização subcelular da proteína expressa pela ORF estudada, sugerindo a ausência de sua participação na localização flagelar e na formação inadequada do septo divisional como evidenciado no estudo feito em *P. aeruginosa*. Além disso, dados de produção de biofilme nos relevaram que o produto da ORF estudada não interfere na formação desta matriz em *X. citri* como ocorre no estudo de outros genes relacionados à motilidade. Desta forma, concluímos que a ORF XAC1934 se trata da homóloga *fleN* em *X. citri*, sendo um potencial alvo para futuros antimicrobianos visto que a correta formação flagelar é uma característica essencial para o seu sucesso infectivo.

Palavras-chaves: Cancro cítrico. XAC1934. FleN.

ABSTRACT

Citrus canker is a disease that affects all economically important varieties of citrus cultivars worldwide. Currently, it represents a threat to the world's biggest sweet orange juice producers: São Paulo state, Brazil, and Florida, USA. The canker etiologic agent is the Gram-negative bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Its genome knowledge has driven to discoveries and advances in the study of the causal agent of this disease. However, this microorganism's essential microbiological processes are still underexplored. Therefore, the understanding of these mechanisms and its effectors can be useful in antibiotics development in order to prevent citrus canker infections. Our group have shown recently that esters of galic acid are potent inhibitors of cell division in *X. citri*. In this work, we continue to study essential processes for citrus canker infection such as motility. Bioinformatics analyses revealed that ORF XAC1934 is related to motility in *X. citri*, because there is an identity to *fleN*, a microorganism flagellar formation regulator gene. The motility and infective potential *in planta* results of the mutant deleted for this ORF corroborate the literature, showing a similar pattern presented in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* deleted mutants for *fleN*. Despite this, there was no subcellular localization of the studied ORF protein. It suggests that this ORF does not interfere in flagellar localization nor in adequate divisional septa formation as evidenced in *P. aeruginosa* study. Moreover, biofilm production data revealed that XAC1934 product does not interfere in this matrix formation in *X. citri* as seen in motility genes studies. Thus, we concluded that ORF XAC1934 is the *fleN* homolog in *X. citri*, being a potential target to the future development of new antibiotics because the correct flagellar formation is essential to *X. citri* infection.

Key words: Citrus canker. XAC1934. FleN.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 A citricultura e o cancro cítrico	10
1.2 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	14
1.3 Motilidade bacteriana	16
1.4 Relação entre flagelo e biofilme	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Análise estrutural por ferramentas computacionais	23
3.2 Linhagens bacterianas e cultivo	23
3.3 Geração das cepas mutantes	23
3.4 Seleção do mutante de <i>X. citri</i> expressando FleN-GFP	25
3.5 Confirmação da expressão da fusão proteica FleN-GFP	25
3.6 Microscopias	26
3.7 Formação de biofilme pelo mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$	27
3.8 Motilidade em superfície do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$	27
3.9 Teste de fitopatogenicidade do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Possível <i>fleN</i> de <i>X. citri</i>	29

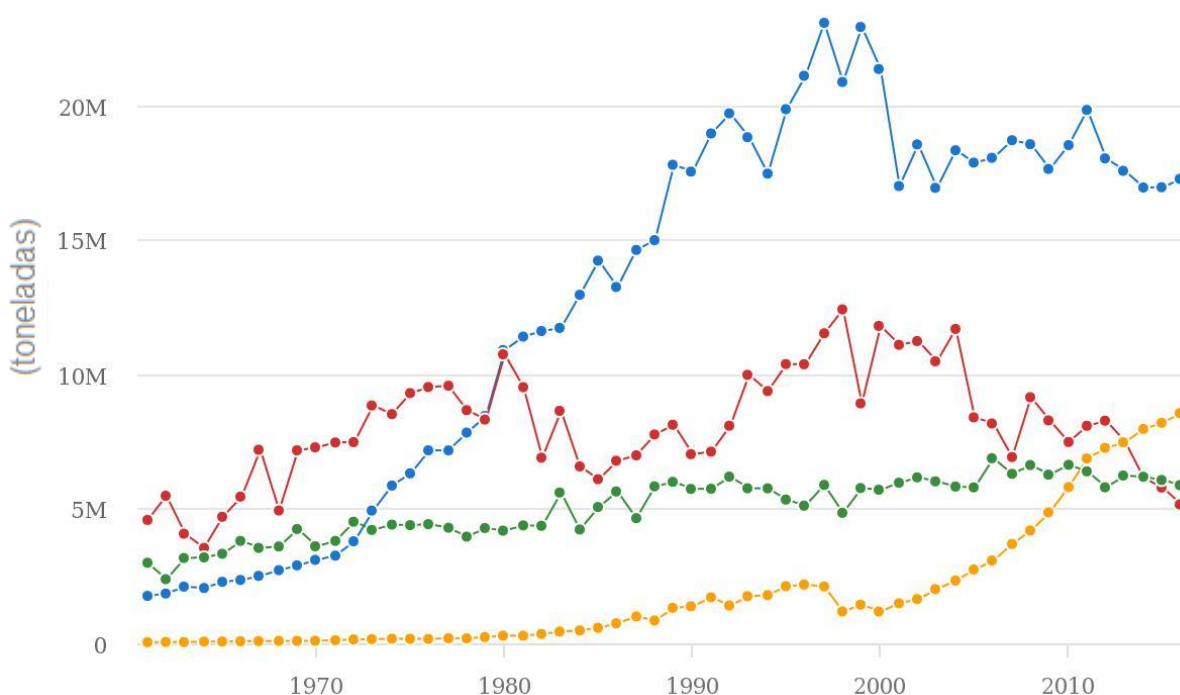
4.2 Expressão de XAC1934 por <i>X. citri</i>	34
4.3 Ausência de localização da proteína de XAC1934 e interferência na formação do septo divisional em <i>X. citri</i>	35
4.4 XAC1934 não interfere na formação de biofilme de <i>X. citri</i>	39
4.5 Interferência de XAC1934 com motilidade de <i>X. citri</i>	40
4.6 XAC1934 não altera a patogenicidade de <i>X. citri</i>	42
5 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 A citricultura e o cancro cítrico

A citricultura no Brasil compreende o cultivo de uma variedade de frutas cítricas, como laranjas, limões, limas, cidras, entre outras, sendo a laranja uma das representantes de maior valor econômico. O Brasil mantém a liderança mundial na produção, exportação e em tecnologia de citros (Figura 1), movimentando anualmente um valoroso mercado de trabalho (CITRUS BR, 2018a). Segundo o CitrusBR (2018b), a estimativa para a produção no parque citrícola brasileiro (São Paulo, Triângulo Mineiro e Sudoeste de Minas Gerais) na safra 2018/19 é de 243,4 milhões de caixas de laranja.

Figura 1 – Produção de laranja em toneladas realizada pelo Brasil (azul), Estados Unidos (vermelho), China (amarelo) e Europa (verde) de 1960 a 2016.



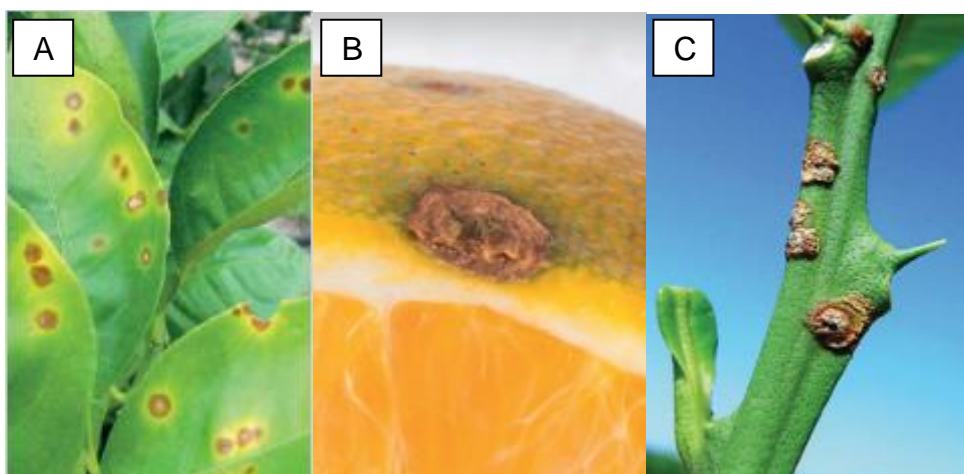
Fonte: FAOSTAT.

Apesar dos números de produção, a citricultura brasileira enfrenta diversas ameaças, como as doenças de citros e a redução de áreas de plantio (NEVES et al., 2010). Dentre as doenças que mais ameaçam a citricultura brasileira está o cancro cítrico tipo A, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* patotipo A e que foi

constatada pela primeira vez em 1957 na região de Presidente Prudente (BITANCOURT, 1957). A propagação da bactéria se dá, principalmente, por meio de chuva em conjunto com ventos e pelo trânsito de ferramentas inerentes à atividade agrícola, que são considerados os principais agentes de dispersão. Uma vez em contato com a planta, a bactéria penetra por aberturas naturais (estômatos ou hidatódios) ou por ferimentos e se aloca no mesófilo onde forma pequenas colônias. A bactéria, uma vez em contato com as células vegetais do mesófilo, injeta suas proteínas efetoras por meio de sistemas secretores. Essas proteínas podem suprimir o sistema de defesa vegetal e modular a transcrição da planta, permitindo a formação do cancro cítrico.

Algumas das alterações fenotípicas da planta são a hiperplasia e a hipertrofia que causam a ruptura da epiderme vegetal (Figura 2) e proporciona a dispersão da bactéria feita pelo vento ou mecanicamente (BOCH; BONAS, 2010). Essas lesões epiteliais podem culminar na queda das folhas e dos frutos prematuros (GOTTWALD; PIERCE, 2002; MOREIRA et al., 2010), o que leva a uma perda de alguns frutos e geração de prejuízos para o setor agrícola.

Figura 2 - Lesão de cancro cítrico causado pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em folhas (A), fruto (B) e ramo (C) de laranjeiras.



Fonte: modificado de BEHLAU; SALA; BEOZZO BASSANEZI, 2017.

Os sintomas da cancriose são agravados pela presença da larva minadora de citros *Phyllocnistis citrella stainton* (Lepidoptera: Gracillariidae), que causa ferimentos no mesófilo facilitando a penetração da bactéria e aumentando a disseminação da doença (CHAGAS et al., 2001; BEHLAU; SALA; BEOZZO BASSANEZI, 2017) (Figura 3). Além dos danos relacionados à qualidade e quantidade de frutas, a doença também resulta em impactos socioeconômicos graves e que estão relacionados aos padrões de mercado para exportação. A comercialização de frutas *in natura* é regulamentada por legislação, na qual o cancro cítrico é considerado uma “praga quarentenária” (BRASIL, 2018).

Figura 3 – Ilustração da lesão foliar de laranjeira causada pela larva minadora de citros (*Phyllocnistis citrella stainton*).



Fonte: BEHLAU; SALA; BEOZZO BASSANEZI, 2017.

A erradicação de plantas sintomáticas e das suspeitas de infecção é a forma mais eficaz de controle conhecido para o cancro e, de certa forma, determinou o sucesso da sanidade no estado de São Paulo anterior a 2009 (BELASQUE JUNIOR et al., 2009). Entretanto, após alterações nos critérios relacionados à erradicação do cancro cítrico pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA/SP) em julho de 2009, houve uma queda no alto nível de sanidade dos pomares (conquistado através da legislação adotada entre 1999 a 2009). Neste período, era praticada a erradicação de todas as plantas de um talhão quando a incidência de plantas sintomáticas fosse $\geq 0,5\%$; sendo menor, operava-se a remoção de plantas em um raio de 30 metros a partir da planta sintomática (BELASQUE JUNIOR et al., 2010). Posteriormente (Instrução Normativa nº 37 05-09-2016), houve nova alteração de legislação, a qual categoriza as propriedades com espécies dos gêneros *Citrus*, *Fortunella* ou *Poncirus* em quatro grupos fitossanitários: área com praga ausente, área

livre da praga, área sob erradicação ou supressão, e área sob sistema de mitigação de risco.

Segundo essa normativa, as áreas com praga ausente são as que não apresentam suspeitas nos levantamentos fitossanitários. As áreas livres da praga são aquelas em que não há ocorrência de cancro cítrico comprovada cientificamente. Áreas sob erradicação ou supressão do cancro cítrico são as propriedades em que a praga está presente, mas não de uma forma amplamente distribuída e são empregadas medidas oficiais de prevenção, vigilância e controle a fim de eliminar as plantas contaminadas e as que apresentam suspeita de contaminação para que a praga seja erradicada ou reduzida a sua incidência. E as áreas sob sistema de mitigação e risco são aquelas que apresentam a execução de diferentes medidas de manejo de risco contra o cancro cítrico (BRASIL, 2016).

Para uma propriedade ser inscrita como área sob sistema de mitigação e risco, deve apresentar equipamentos e infraestrutura capazes de realizar lavagem e higienização dos frutos, uso de veículos fechados para a desvitalização do cancro cítrico, ou para destruição de frutos e restos vegetais. Para que haja uma menor dispersão da praga, deve-se adotar algumas medidas de manejo, tais como: uso de cultivares mais resistentes ao cancro cítrico aprovados pelo OEDSV (Órgão Estadual de Defesa Sanitária Vegetal), destruição de frutos contaminados, manejo integrado do minador dos citros dado pela espécie *Phyllocnistis citrella*, desinfecção de ferramentas e máquinas com hipoclorito de sódio, uso de quebra-ventos e pulverização com calda cúprica com 0,1% de cobre metálico em todas as plantas em um raio de trinta metros a partir da planta diagnosticada. Somente será habilitada a colheita se a propriedade apresentar, no máximo, um por cento dos frutos sintomáticos para o cancro que devem ser destruídos. Os frutos devem ser lavados com detergente e imergidos em hipoclorito de sódio a 200 ppm com pH 7,0 por 2 min. Caso não sejam cumpridas essas determinações, que serão verificadas semestralmente pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o OEDSV pode decretar a eliminação das plantas diagnosticadas. Juntamente com a fiscalização do MAPA, o produtor deverá realizar uma vistoria trimestral para detectar novos focos de contaminação que deverá ser comunicado ao OEDSV (BRASIL, 2016).

A suspeita da presença da praga levará à interdição imediata do imóvel como medida cautelar. Sendo diagnosticado o cancro cítrico, as propriedades dentro do raio

de erradicação também serão interditadas e vistoriadas. Para efeitos de erradicação, serão eliminadas a planta foco e todas as que estiverem em um raio de 30 metros, mesmo que invada a propriedade vizinha, sendo realizada uma vistoria a cada sessenta dias pelo responsável técnico até completar dois anos após a última eliminação que desinterditará a área, caso não sejam detectadas plantas com cancro cítrico (BRASIL, 2016).

Estas medidas podem contribuir para a evolução do endemismo do cancro cítrico no estado de São Paulo, como já é o caso de estados mais ao sul do Brasil, e também na Argentina (FERREIRA; BELASQUE JR., 2011). Nessas regiões, citricultores aplicam manejo integrado com plantio de cultivares de laranjeiras menos suscetíveis (resistência total é desconhecida), uso de quebra-ventos para minimizar a disseminação da bactéria e *sprays* de formulações cúpricas. Tais medidas, especialmente a aplicação de cobre, deixam resíduos no solo e provavelmente contribuem para o aparecimento de linhagens resistentes de *X. citri* (BEHLAU et al., 2011, 2013).

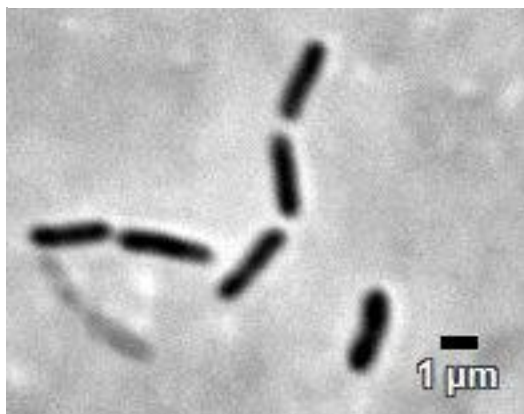
A nova instrução normativa de 2018 (IN nº 21) flexibiliza o manejo dos frutos sintomáticos que podem ser levados à indústria de suco, que deve estar localizada dentro da área de Sistema de Mitigação de Risco, sendo transportado por veículos fechados ou cobertos (BRASIL, 2018). Outra mudança apresentada diz respeito às áreas que adotam a erradicação que podem pulverizar a solução cúprica ou eliminar as plantas em um raio de 30 m a partir da planta infectada (BRASIL, 2018; FUNDECITRUS, 2018).

1.2 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Xanthomonas citri subsp. *citri* patotipo A (SCHAAD et al., 2005, 2006) é um fitopatógeno que ataca todas as principais variedades comerciais de citros e é o agente causal do cancro cítrico asiático ou cancrose do tipo A, que representa a forma mais generalizada e grave da doença (GOTTWALD et al., 2002). Suas células apresentam morfologia de bastonete (Figura 4) e suas colônias isoladas em placa apresentam coloração amarelo-alaranjado devido à produção do pigmento protetivo xantomonadina, característico do gênero (AMARAL, 2003; MARTINS et al., 2010). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* possui um cromossomo de 5.17 Mb e dois plasmídeos: pXAC33 (33.699 pb) e pXAC64 (64.920 pb). O sequenciamento completo do genoma

mostrou um conteúdo de G+C de aproximadamente 64%, 4.313 ORFs (*open reading frame*) foram anotadas e, dentre estas, 2.710 apresentaram identidade com genes codificando para proteínas conhecidas. As 1.603 ORFs restantes foram classificadas como hipotéticas, entre estas, 1.272 foram consideradas conservadas por apresentarem identidade com ORFs de mesma categoria em outros organismos (DA SILVA et al., 2002).

Figura 4 – Microscopia de contraste de fase de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com aumento de 100X.



Fonte: dado da pesquisa.

A disponibilidade do genoma de *X. citri* tem contribuído para estudos funcionais diversos nesta bactéria (YAN; WANG, 2011; KRAISEL BURD et al., 2012; LI; WANG, 2012; MALAMUD et al., 2012; SGRO et al., 2012; GUZZO et al., 2013; HUANG; LU; CHEN, 2013). Além das homologias encontradas entre ORFs anotadas no genoma de *X. citri* e fatores em vias metabólicas determinadas, grupos têm se valido das informações do genoma para estudar candidatos associados à patogenicidade e interação com o hospedeiro citros. O conhecimento do genoma também apoia estudos de mutagênese em larga escala utilizando-se transposons e viabiliza a identificação de ORFs/genes envolvidos em processos diversos em caracterização (LAIA et al., 2009; YAN; HU; WANG, 2012). Contudo, ainda são restritos os trabalhos sobre caracterização de processos biológicos essenciais nesta bactéria como segregação cromossômica, divisão e crescimento celular (MARTINS et al., 2010; UCCI et al., 2014).

De modo geral, diversos fatores proteicos envolvidos em divisão celular e segregação cromossômica são específicos de bactérias (ERRINGTON; DANIEL; SCHEFFERS, 2003; LEONARD; MOLLER-JENSEN; LOWE, 2005; HARRY;

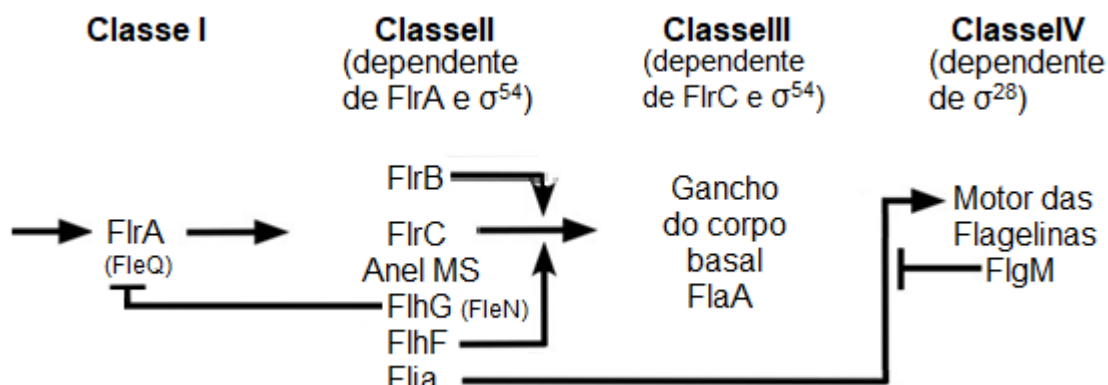
MONAHAN; THOMPSON, 2006; MIERZEJEWSKA; JAGURA-BURDZY, 2012). Nosso grupo tem investido na caracterização de uma seleção de tais proteínas para o desenvolvimento de inibidores antibacterianos (SILVA et al., 2013; UCCI et al., 2014). Recentemente, demonstramos que ésteres de ácido gálico interferem com processos de segregação cromossômica e divisão celular ao interferir com a localização subcelular das proteínas ParB-GFP (segregação (UCCI et al., 2014)) e GFP-ZapA (divisão (SILVA et al., 2013)) em *X. citri*. Estes dados apoiam o desenvolvimento de novos compostos inibidores de processos essenciais neste organismo, e que podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle do cancro cítrico. Além disto, nossos dados sugerem uma interligação dos processos de segregação cromossômica e divisão celular em *X. citri*, assim como já foi observado em outras bactérias, como exemplos *Caulobacter crescentus*, *Streptomyces coelicolor*, *Mycobacterium smegmatis* e *Corynebacterium glutamicum* (THANBICHLER; SHAPIRO, 2006; DONOVAN et al., 2010).

1.3 Motilidade bacteriana

O flagelo é uma estrutura que auxilia as bactérias na motilidade por *swimming* (KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013). Seu desenvolvimento demanda muita energia; para tanto, uma regulação precisa de seus genes é essencial (CORREA; PENG; KLOSE, 2005). A formação do flagelo se inicia pela inserção do aparato de secreção na membrana plasmática (MACNAB, 2003), que é utilizado para que os componentes da formação do flagelo sejam secretados e adicionados ao final do flagelo crescente em uma ordem específica (YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2002). Em *V. cholerae*, a transcrição dos genes flagelares é organizada em quatro classes gênicas (Figura 5). A classe I é composta apenas pela FlrA (homóloga à FleQ), regulador principal da formação do flagelo, que, juntamente com a RNA polimerase- σ^{54} , ativa a expressão da classe II. Os genes incluídos na classe II formam componentes estruturais como anel MS (membrana/supramembrana), *switch*, aparato de secreção e os genes reguladores: FlrB, FliA (σ^{28}), FlhG (homóloga à FleN) e FlrC. Esta última proteína, juntamente com a RNA polimerase- σ^{54} , ativa a expressão da classe III que engloba o corpo basal, o gancho e a flagelina, FlaA. E, por fim, a RNA

polimerase- σ^{28} ativa a expressão da classe IV que inclui genes de filamentos adicionais, bem como genes motores (PROUTY; CORREA; KLOSE, 2001).

Figura 5 – Esquema da via metabólica de formação do flagelo em *Vibrio cholerae*.



Fonte: adaptado de CORREA; PENG; KLOSE, 2005.

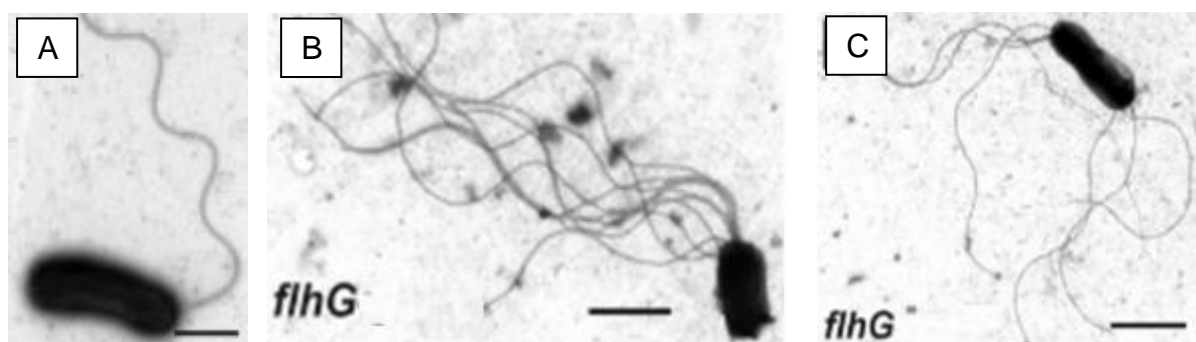
Em *P. aeruginosa*, *FleN* é uma proteína que contém 280 amino ácidos, apresenta um domínio derivado do Walker A que forma um P-loop, interagindo com o fosfato do ATP e apresentando atividade ATPásica (KOONIN, 1993; DASGUPTA; RAMPHAL, 2001; BARAQUET; HARWOOD, 2013). Por ser uma derivação do domínio Walker A, esta proteína apresenta baixa atividade ATPásica (BARAQUET; HARWOOD, 2013). Segundo Leipe e colaboradores (2002) e Kazmierczak e Hendrixson (2013), *FleN* é pertencente à classe de proteínas de ligação a nucleotídeos, SIMIBI, que estão relacionados com partição ou localização de outros componentes celulares em eucariotos e procariotos.

Em *P. aeruginosa* e em *V. cholerae*, a deleção de *fleN* gera uma sobre expressão dos genes estruturais e regulatórios da formação do flagelo, levando a um fenótipo multiflagelado que apresenta uma motilidade deficitária (DASGUPTA; ARORA; RAMPHAL, 2000; DASGUPTA; RAMPHAL, 2001; KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013). Os flagelos não são imóveis, mas não apresentam uma natação direcionada (DASGUPTA; ARORA; RAMPHAL, 2000; KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013). Já a sobre expressão de *FleN* reduz a flagelação em *P. aeruginosa* (DASGUPTA; RAMPHAL, 2001). A deleção de *fleN* leva à formação de até dez flagelos por célula em *V. cholerae*, podendo estar dispostos em lofotríquios ou anfitríquios (Figura 6) (CORREA; PENG; KLOSE, 2005). Após alguns dias de incubação, o mutante para *fleN* de *V. cholerae* recupera sua motilidade e diminui o

número de flagelos, possivelmente porque a sobre expressão flagelar seja deletéria, o que poderia levar a um mecanismo compensatório de regulação da expressão de FlrA (homólogo à FleQ) já que a formação de flagelo demanda muita energia (CORREA; PENG; KLOSE, 2005).

O mutante de *fleN* de *V. cholerae* apresenta uma taxa dez vezes menor de infecção que a selvagem, mas com mesmas medidas de toxinas liberadas (CORREA; PENG; KLOSE, 2005), evidenciando que a deleção não alterou sua virulência.

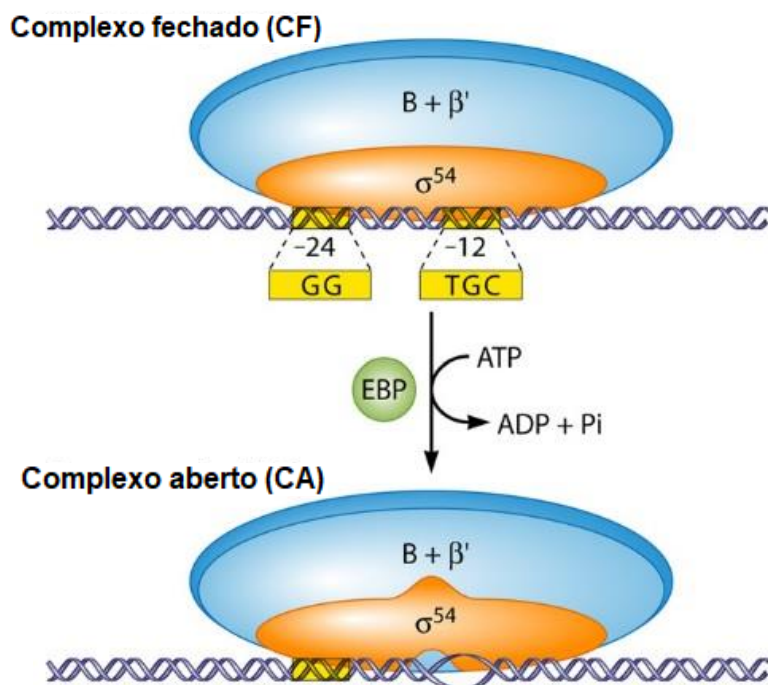
Figura 6 – Microscopia eletrônica de transmissão de *Vibrio cholerae* selvagem (A) apresentando apenas um flagelo polar e os mutantes $\Delta flhG$ (homóloga à *fleN* em *V. cholerae*) com multiflagelação em lofotríquio (B) e anfitríquio (C).



Fonte: adaptado de CORREA; PENG; KLOSE, 2005.

FleN apresenta uma atividade antagônica à FleQ, que é um regulador transcricional de genes estruturais e reguladores para a formação do flagelo que são importantes para a manutenção do único flagelo de *P. aeruginosa* (HARSHITA; CHANCHAL; JAIN, 2016). A deleção de *fleN* em *V. cholerae* mostrou uma elevada expressão de FleQ, o que leva a hipótese de que esse fato pode contribuir para a super expressão de genes flagelares, culminando na multiflagelação (CORREA; PENG; KLOSE, 2005). Já em *P. aeruginosa*, FleN inibe a atividade ATPásica de FleQ (BARAQUET; HARWOOD, 2013). De modo geral, o mecanismo de controle da expressão da classe II dos genes da transcrição flagelar ocorre pela hidrólise de ATP que promove a remodelagem do complexo fechado da σ^{54} -RNA polimerase, o que permite que a fita de DNA se posicione no sitio ativo da RNA polimerase (BOSE et al., 2008; BUSH; DIXON, 2012). O fator σ^{54} direciona a ligação da RNA polimerase ao promotor, formando um complexo fechado que deve ser aberto por FleQ ao hidrolisar ATP, remodelando a holoenzima e permitindo a formação da bolha de transcrição (BUSH; DIXON, 2012) (Figura 7).

Figura 7 – Esquema da mudança de conformação do complexo fechado (CF) da holoenzima σ^{54} -RNA polimerase para o complexo aberto (CA) pela atividade ATPásica da proteína potenciadora de ligação (EBP: FleQ), permitindo a formação da bolha de transcrição no DNA.



Em *Campylobacter jejuni*, a deleção de *fleN* leva à formação de minicélulas (BALABAN; HENDRIXSON, 2011), mas o mecanismo de ação ainda não é conhecido. Sugere-se que FleN localize a formação do anel MS que inibiria a formação do septo no polo (KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013). Porém essa deleção não apresenta o mesmo efeito em *P. aeruginosa* (KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013). FleN pode estar associada com a localização flagelar, visto que esta proteína apresenta interação com a atividade GTPásica de FlhF como ocorre em *Vibrio alginolyticus* (KUSUMOTO et al., 2008; KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013).

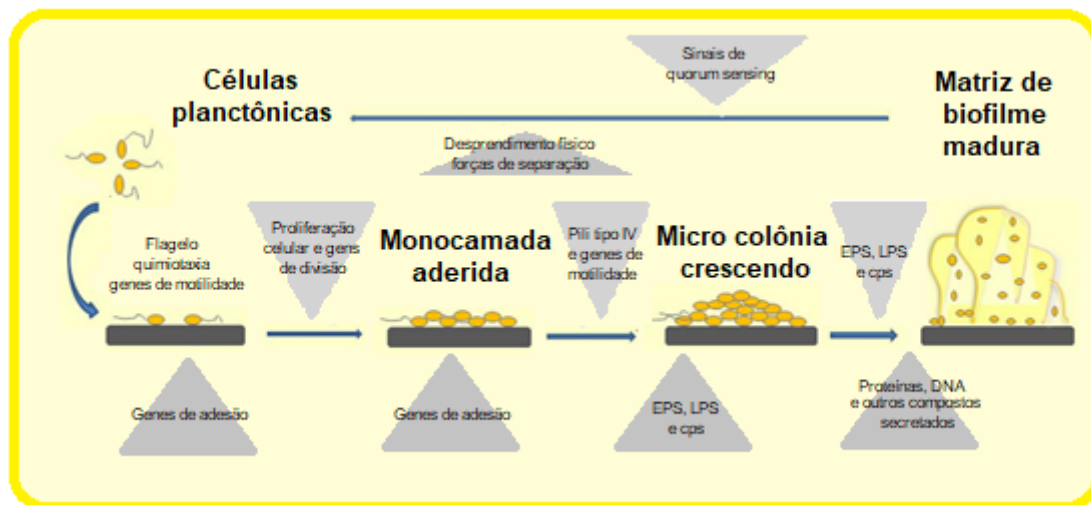
1.4 Relação entre flagelo e biofilme

Tão relevante como a natação, o biofilme também apresenta uma importante relação com a infecção de *X. citri* em citros. Trata-se de uma matriz de exopolissacarídeos, DNA, proteínas e restos celulares que pode agregar uma única

espécie bacteriana ou um consórcio microbiano que se adere a uma superfície ou se encontra na forma planctônica (KUMAR et al., 2017; ROY et al., 2018). Esse sistema proporciona proteção em habitats inóspitos, o que é considerado de extrema importância para ciclos de enfermidades bacterianas em plantas e animais (MALAMUD et al., 2011).

A formação do biofilme (Figura 8) se inicia pela adesão da bactéria planctônica à superfície para que seja formado um *cluster* que irá crescer e recrutar outras células para seu crescimento e formação da micro colônia. Na porção interior desta estrutura, encontra-se uma organização celular em forma de torres que se mantêm unidas pela presença de uma matriz de exopolissacarídeo que contém restos de células mortas, DNA e proteínas (LI; WANG, 2011; MALAMUD et al., 2013). Após essa adesão, a colônia começa a se dispersar através da liberação de bactérias das micro colônias (MALAMUD et al., 2013).

Figura 8 - Esquema da sequência de formação do biofilme em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.



Fonte: adaptado de LI; WANG, 2011.

Segundo Karatan e Watnick (2009), o flagelo permite que a bactéria nade em direção a um nutriente associado a uma superfície e/ou uma substância atrativa liberada por células aderidas, ou desloque-se no contra fluxo de substância nocivas. Em *Escherichia coli*, a ausência de flagelo não permite a formação de um biofilme organizado. Segundo Van e Michels (2005) seria pela importância que esta estrutura apresenta na superação à repulsão de determinadas superfícies.

Nosso grupo tem trabalhado no desenvolvimento de marcadores intracelulares que são utilizados em *screenings* de antimicrobianos (SILVA et al., 2013; UCCI et al.,

2014; KRÓL et al., 2015; LORENZONI et al., 2017), tais como proteínas do tipo ParA. Estas proteínas são ATPases que operam diversas funções em bactérias, dentre elas: segregação cromossômica (ParA típica, expressa normalmente por gene em mesmo operon que *parB* (MIERZEJEWSKA; JAGURA-BURDZY, 2012)), divisão celular (MipZ em *C. crescentus* (THANBICHLER; SHAPIRO, 2006)), quimiotaxia (ParC, *V. cholerae* (RINGGAARD et al., 2011)) e motilidade (*P. aeruginosa* (BARTOSIK et al., 2009)). No caso de motilidade em *P. aeruginosa*, a falta de ParB, e conseqüentemente a ausência do par íntegro ParA/B envolvidos com segregação cromossômica, promove efeitos pleiotrópicos, sendo um deles a alteração de motilidade do tipo *swimming* (BARTOSIK et al., 2009). Durante o ciclo celular bacteriano, cada vez mais observamos que tais proteínas interligam processos e que tais associações constituem provavelmente *checkpoints* para coordenar o funcionamento dos sistemas. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* possui diversas ORFs anotadas como *parA*. A típica em operon com *parB* é a XAC3905 (UCCI et al., 2014). Sabendo que estas *parAs* órfãs podem estar envolvidas em processos infecciosos de *X. citri* como em outros micro-organismos através da formação de biofilme, quimiotaxia e motilidade (BARTOSIK et al., 2009; MALAMUD et al., 2011; RINGGAARD et al., 2011), o presente trabalho visou identificar dentre ORFs anotadas como tipo *parA* em *X. citri* alguma que tivesse relação com motilidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Buscar e caracterizar uma ORF tipo *parA* que seja essencial ou esteja relacionada com motilidade em *X. citri*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar ORFs do tipo *parA* em *X. citri* que possam estar relacionadas com motilidade;
- Estudar se esta ORF é expressa em condições naturais por *X. citri*;
- Verificar se a ORF é essencial para a motilidade em *X. citri*;
- Averiguar se esta ORF apresenta relação com formação de biofilme;
- Investigar possível relação da ORF com divisão celular;
- Avaliar se esta ORF altera o potencial de infecção de *X. citri*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise estrutural por ferramentas computacionais

A sequência da ORF XAC1934, homóloga à FleN de *V. cholerae*, foi identificada em bancos de dados utilizando Blast (ALTSCHUP et al., 1990). Os alinhamentos das sequências primárias de aminoácidos foram feitos com ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON T.J., 1994). A investigação de domínios proteicos se utilizou do PFAM (FINN et al., 2015) e DELTA-BLAST (BORATYN et al., 2012). Para a interação entre proteínas, foi utilizado o programa STRING (SZKLARCZYK et al., 2017) e a estrutura terciária foi investigada com o programa Phyre2 (KELLY et al., 2015).

3.2 Linhagens bacterianas e cultivo

A linhagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizada foi o isolado 306 (IBSBF 1594) (SCHAAD et al., 2006). *Escherichia coli* DH10B (*F* *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *ara* Δ 139 Δ (*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK* λ -*rpsL* (*Str^R*) *nupG*) foi utilizada para as clonagens. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi cultivada a 29°C em meio NYG (Peptona 5 g/L, extrato de levedura 3 g/L e glicerol 20 g/L) com ou sem ágar. Linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB a 37°C, acrescido ou não de ágar (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Os antibióticos Ampicilina e/ou Canamicina (20 µg/mL) foram adicionados aos meios de cultivo quando necessário.

3.3 Geração das cepas mutantes

Técnicas básicas de Biologia Molecular e preparo de soluções seguiram Sambrook et al. (1989). Extração de DNA total de *X. citri* foi realizado com o kit Invisorb Spin Tissue Mini (Invitek, código 10321003). Desenho de *primers* (APÊNDICE A, p. 54) foi realizado manualmente com checagem de estruturas secundárias,

possibilidade de formação de dímeros e grampos com auxílio do programa livre GeneRunner.

A verificação da transcrição natural dessa ORF em *X. citri* foi feita por RT-PCR com coleta do cultivo feito em NYG na fase exponencial de crescimento (log), extração de RNA total seguindo protocolos da Qiagen e Fermentas e reação de PCR contendo 0,2 mM de dNTPs; 0,2 µM dos *primers* fleN F (NheI) e fleN R (XhoI) (APÊNDICE A, p. 54); tampão na concentração 1X e 1,25 U de Taq (Thermo) em um ciclo feito em termociclador Bio Rad (modelo T100) com um patamar de 94°C por 3 min e um ciclo de 94°C por 45 seg, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min repetidos 35 vezes. Para a obtenção do fragmento XAC1934 (*fleN*) (APÊNDICE B, p.54), que foi utilizado para a marcação com GFP (*green fluorescent protein*), um PCR de alta fidelidade foi feito com enzima Pfu (Thermo Scientific) mantendo as concentrações descritas acima e submetido ao ciclo em termociclador Bio Rad (modelo T100) de 94°C por 30 seg, 60°C por 1 min e 70°C por 2 min 30 seg repetidos 35 vezes com os *primers* fleN F (NheI) e fleN R (XhoI) (APÊNDICE A, p. 54). Com o objetivo de deletar essa ORF do genoma de *X. citri*, foram feitas as amplificações dos fragmentos *upstream* (up34: XAC 2914884..2915755) e *downstream* (dn34: XAC 2916593..2917465) dessas regiões (APÊNDICE C, p. 55) a partir de PCRs utilizando Phusion (Thermo Scientific) e 5% de DMSO em termociclador Bio Rad (modelo T100) com mesmas concentrações descritas acima e ciclo de 98°C por 10 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg repetidos 35 vezes e *primers* upXAC1934F2 (SpeI) e upXAC1934R2 (BglIII) para o fragmento upstream; downXAC1934F2 (BglIII) e downXAC1934R2 (SpeI) para o fragmento downstream (APÊNDICE A, p. 54).

As sequencias foram averiguadas por sequenciamento de Sanger. Todos os vetores para clonagem, expressão de proteínas (em fusão com GFP) e *knockout* em *X. citri* foram desenvolvidos pelo grupo e estão disponíveis em nosso laboratório (APÊNDICE D p. 55).

A transformação de *X. citri* seguiu o protocolo descrito pelo grupo com modificações (FERREIRA et al., 1995). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi cultivada em 100 mL de meio CG a 29°C e 200 rpm por 16 horas em *shaker* Innova (modelo 4230). Massa celular referente a este cultivo (DO_{600nm} entre 0,4 e 0,9) foi coletada por centrifugação a 1878 xg por 10 min a 4°C em centrífuga Eppendorf (modelo 5430R) e lavada por três vezes em água Mili-Q gelada esterilizada (por centrifugação) para remoção completa de sais do meio de cultivo. Seguindo-se a última lavagem, células

foram dissolvidas em 1 mL de água gelada esterilizada e disposta em cubetas (100 μ L) de eletroporação (Bio Rad) com separação de eletrodos de 0,2 cm. O plasmídeo de marcação de FleN com GFP (pKUS2 - APÊNDICE E, p. 55) inserido em *X. citri* foi misturado às células nas cubetas e as mesmas foram submetidas a choque de 2,4 kV por 5 ms. As células foram resgatadas em meio NYG e cultivadas por 4 horas com leve agitação (100 rpm) em *shaker* Innova (modelo 4230) antes do plaqueamento em meio NYG sólido contendo Canamicina (20 μ g/mL).

O *knockout* gênico de *fleN* foi realizado através do mesmo processo de transformação de *X. citri*. Porém, utilizando o plasmídeo pKUS4 (APÊNDICE E, p. 55)

A comprovação das deleções foi feita por PCRs diagnósticos (APÊNDICE F, p. 55) e posterior sequenciamento da região deletada.

3.4 Seleção do mutante de *X. citri* expressando FleN-GFP

A integração de pKUS2 em *amy* ou no *locus* de *fleN* foi determinada pelo teste do amido (APÊNDICE G, p. 55) em que os transformantes XAC1934::pKUS2 e *amy*::pKUS2 foram inoculados em meio NYG sólido contendo 0,2% de amido e mantidos em incubadora Ethik (modelo 411D) a 29°C por 24 horas para depois serem expostos ao vapor de iodo.

Os mutantes com o crescimento mais próximos ao de *X. citri* selvagem foram selecionados para microscopia. Portanto, as curvas de crescimento dos mutantes XAC1934::pKUS2 e *amy*::pKUS2 foram feitas com cultura de células crescidas por 16 horas com sua DO_{600nm} ajustada para 0,1 em placas de 24 poços com 1,5 mL como volume final por poço em placa de poliestireno de 24 poços para o início da curva. As curvas foram feitas no leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek) em que foram feitas leituras da DO_{600nm} a cada 30 min por 48 h. As análises foram feitas com uso do programa Graphpad Prism 6 com regressão não-linear suavizada (LOWESS).

3.5 Confirmação da expressão da fusão proteica FleN-GFP

A correta expressão da fusão proteica FleN-GFP foi averiguada por Western-Blot em que foi feito um inóculo de XAC1934::pKUS2 e *amy*::pKUS2 em meio NYG que foi induzido na DO_{600nm} 0,3 com uma concentração final de 0,03% de arabionose

e coletado após 30 min para ser lavado com água Mili-Q por centrifugação (1,5 mL de amostra foi centrifugada a 10.000 xg por 1 min em centrífuga Eppendorf (modelo 5430R), descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de água Mili-Q, que foi centrifugado nas mesmas condições para o *pellet* ser guardado. O *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de tampão de lise (1 mL tris HCl pH 6,8 0,5M; 1,6 mL SDS 10% e 5,4 mL de água Mili-Q), submetido à 100°C por 5 min e centrifugado por 10 min a 12.000 xg em centrífuga Eppendorf (modelo 5430R). Cinquenta microlitros do sobrenadante foram separados para quantificação de proteínas pelo kit da Bio-Rad. Após a padronização da concentração de todas as amostras, estas foram submetidas a uma corrida em gel de poliacrilamida 12% por 2 horas a 100 V.

A eletrotransferência foi feita em membrana de PVDF durante uma hora com uma corrente de 1,2 V/cm². Foi utilizado anticorpo primário anti-GFP policlonal feito em coelho (Sigma-Aldrich) e secundário anti-rabbit feito em cabra acoplado a HRP (Millipore). A revelação foi realizada com papel fotográfico (Amersham Hyperfilm ELC GE) que foi exposto ao revelador e fixador (Kodak).

3.6 Microscopias

Para a visualização do mutante expressando FleN-GFP, foi feito um pré-inóculo deste e de *Xac* WT (selvagem) em meio NYG, que foram mantidos a 29°C e 200 rpm em *shaker* Innova (modelo 4230) por 16 horas. Ajustou-se a DO_{600nm} destes cultivos para 0,1 e estes foram incubados nas mesmas condições até atingirem DO_{600nm} de 0,3 em que foram induzidos com arabinose na concentração final de 0,03%. A observação foi feita em microscópio Olympus BX-61 com captura de imagem feita por câmera monocromática Orca-Flash 2.8 Hamamatsu e uso do software CellSens Dimension para o tratamento das imagens após 30 min de indução com lâminas montadas com salina (NaCl 0,85%) estéril contendo agarose 0,9%.

A observação do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ (*X. citri* que apresenta deleção da ORF XAC1934) e de *X. citri* WT foi feita nas mesmas condições, apenas não havendo indução com arabinose. Foram medidas entre 100 e 200 células com o software CellSens Dimension.

3.7 Formação de biofilme pelo mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$

A interferência da expressão de FleN com a formação do biofilme em *X. citri* foi averiguada pelo teste descrito por Yan et al. (2012) com modificações em que *X. citri* WT e o mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ foram incubados em meio mínimo por 16 horas a 29°C e 200 rpm em *shaker* Innova (modelo 4230). A DO_{600nm} de cada cultivo foi ajustada para 0,3 e 7 mL de cada cultivo foram coletados e centrifugados a 1878 xg por 10 min em centrífuga Eppendorf (modelo 5430R). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 7 mL de meio mínimo a fim de retirar metabólitos secundários do pré-inóculo. Um mL da cultura ressuspensionada foi depositado em cada poço da placa de poliestireno de 24 poços da Kasvi (modelo K12-024) e esta foi incubada em incubadora Ethik (modelo 411D) por 96 horas. Após a incubação, o meio foi retirado e 1,5 mL de cristal violeta 0,1% (CV) foi adicionado em cada poço e a placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente. O CV foi descartado e cada poço foi lavado com 1,5 mL de água mili-Q. Adicionou-se 1 mL de DMSO e a placa foi mantida em agitação de 300 rpm em agitador Gehaka (modelo AO-330) por 16 horas. A leitura de absorbância foi feita em leitor de placas synergy (modelo H1, BioTek) usando-se o λ 595 nm. O experimento foi executado com seis réplicas.

3.8 Motilidade em superfície do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$

A relação da expressão da ORF XAC1934 com a motilidade foi verificada pelo teste de motilidade em superfície descrito por Malamud et al. (2011) com modificações. Pré-inóculos de *X. citri* WT e $\Delta fleN_{XAC1934}$ foram feitos em meio NYG e incubados por 16 horas a 29°C e 200 rpm em *shaker* Innova (modelo 4230). As DO_{600nm} foram ajustadas para 0,1 com meio NYG e estes inóculos foram mantidos nas mesmas condições até que atingissem DO_{600nm} 0,3. Foram feitas inoculações tangenciais em placas contendo NYGb (0,25% de ágar) mantidas em incubadora Ethik (modelo 411D) a 21°C. Os halos de crescimento foram medidos com paquímetro digital.

3.9 Teste de fitopatogenicidade do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$

Para averiguar se a deleção de *fleN* alteraria a fitopatogenicidade de *X. citri*, foi feito o teste de infiltração como descrito por Silva e colaboradores (2013) com modificações. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* selvagem e o mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ foram cultivados em meio NYG líquido a 29°C e 200 rpm por 16 horas em *shaker* Innova (modelo 4230) e suas DO_{600nm} foram ajustadas para 0,1 para que fossem incubadas nas mesmas condições até que atingissem DO_{600nm} 0,3. Dez mililitros destes cultivos foram centrifugados a 1878 xg por 15 min em centrífuga Eppendorf (modelo 5430R) e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 10 mL de salina estéril (NaCl 0,85%) e uma diluição 1:1000 foi feita em salina estéril. As folhas de laranja doce Pera Rio de tamanho V4 (FUNDECITRUS, 2017) foram previamente higienizadas com álcool 70% e as diluições foram infiltradas na face abaxial das folhas com uso de uma seringa sem agulha. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas e as folhas foram retiradas após 15 dias. Este teste foi feito em triplicata.

O teste de aspersão para comparação de incidência e severidade entre *X. citri* WT e o mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ foi feito a partir de metodologia descrita por Li e Wang (2014) com modificações. Os pré-inóculos das linhagens foram feitos em meio NYG e incubados por 16 horas a 29°C e 200 rpm em *shaker* Innova (modelo 4230). Suas DO_{600nm} foram ajustadas para 0,1 em meio NYG sob as mesmas condições de incubação e esperou-se que atingissem DO_{600nm} 0,4 (10⁸ células/mL), quando foram centrifugados por 10 min a 1878 xg em centrífuga Eppendorf (modelo 5430 R). Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspensado no mesmo volume inicial com salina estéril (NaCl 0,85%). As suspensões foram aspergidas até o ponto de escorrimento (aproximadamente 20 mL por planta) em plantas com folhas entre V4 e V5 (FUNDECITRUS, 2017). As plantas foram mantidas em casa de vegetação com temperatura e umidade controladas e o desenvolvimento dos sintomas foi observado após 30 dias. Foi contada a porcentagem de folhas sintomáticas para o cálculo de incidência. Para os dados de severidade foi utilizado o programa ImageJ (versão 1.8.0_191) em que foi possível obter a área foliar total e contar o número de lesões para se fazer a proporção de lesões por área foliar. Esse teste foi feito em triplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Possível *fleN* de *X. citri*

Em busca da existência de parálogos à *parA* (XAC3905) no genoma de *X. citri*, utilizamos o programa Kegg (KANEHISA et al., 2017), que já disponibiliza esta análise *on line*. Identificamos onze ORFs/proteínas além de XAC3905 parecem ter a função de ParA, dentre estas, XAC1934 que estaria envolvida com quimiotaxia e motilidade (APÊNDICE H, p. 55). A partir da busca recíproca dos melhores parálogos, quando usamos XAC1934 como alvo, outras 7 proteínas foram listadas, e dentre elas XAC3905 (APÊNDICE I, p. 55). Para entendermos qual o grau de identidade entre XAC3905 (*parA*) e XAC1934 (*fleN*), fizemos uma análise do grau de identidade entre estas sequências mediado por alinhamento múltiplo das sequências usando ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON T.J., 1994). Foi possível observar que a identidade entre as sequências é reduzida, apenas 21%, mas este percentual eleva-se para 46% se considerarmos modificação nos resíduos com manutenção de características químicas (similaridade) (Figura 9).

Figura 9 - Alinhamento múltiplo das sequências das proteínas ParA (XAC3905) e FleN (XAC1934). A identidade total entre as sequências foi de 21% e similaridade de 46%. Já a identidade restrita ao domínio ParA (vermelho) foi de 52% com similaridade de 78%; enquanto a identidade apenas do domínio ATPase (verde) foi de 95% com uma similaridade de 100%.

```

xac_XAC3905 -----MARIIAIANQK
xac_XAC1934 MPPVSFFALKICGALPISPVLRSTTMQSREYAKLTNAFPLSATRPEPLGPVRTIAVTGGK
                * * * * *

xac_XAC3905 GGVGKTTAVNLAAGLARAPKRVLLVDLDSQGNATMGSGIDKRDVAASTCDLLLGENSAA
xac_XAC1934 GGVGKTNISANLAVALADMGRKRTL LLDADLG--LANLDVVLGLAPKYTLADLIAGRCTLD
*****. :.***. ** **.*.* * : . : : * : * :

xac_XAC3905 QIRVTAPEGFDLLPGNIDLTAAEIQLMDQGEREQRLKRALAPIRDEYDFILIDCPPALS
xac_XAC1934 EVIIEGPGGVLVVP---AASGRRHMAELAPAQHIGLVNMFSELERDLDMVIDTAAGITD
: : . * * . : * : . . : . * . : : : * : * * . . . :

xac_XAC3905 LTLNALTAADSIIIVPMQCEYYALEGLTALLEIEALR-----ANLNPALIEIEGLR
xac_XAC1934 SVLTFCQAAQDTVVVVCDEPASITDAYALIKVLSRERGVDRLQIIANMVRDPNEGRLLYD
.*. **.: : * : : . * : : . : . * : : . . * : :

xac_XAC3905 TMFDIRNNLANAVSAELTEHFG-DKVFRTIVPRNVRLAEAPSHGQSIVGYDRTSRGGVAY
xac_XAC1934 KLSRVCEKFLGDVSLNYLGHVPQDDWLRLSVQRQPPVIKAYPASPSAQAIIEIARRSRW
.: : : : . * * : * . * : * * : : * . . * . . : * :

xac_XAC3905 LGLAGEIVRRQNDRNKAVRPVETV
xac_XAC1934 QAPTVPGRNVEFFVERIIQRGVAA
. : . : : : : .

```

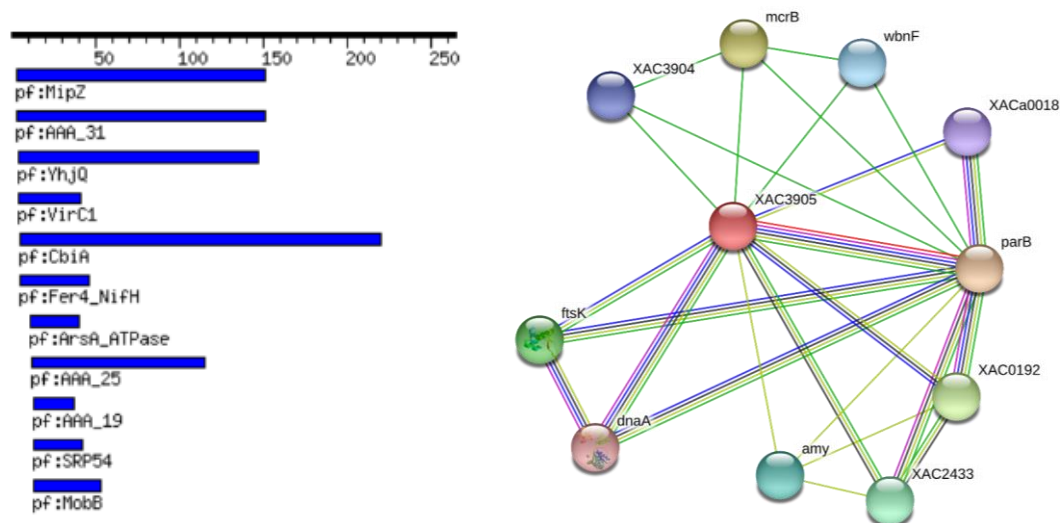
Fonte: dado da pesquisa.

Esta análise corroborou os dados de conservação de domínios pré-estabelecido pelo PFAM (FINN et al., 2015). As Tabela 1 e Tabela 2 exemplificam esta conservação de domínios em XAC3905 e XAC1934 e dados dos demais ortólogos são mostrados no apêndice J (p. 55). Da mesma forma, a análise de interação das proteínas fazendo uso do programa String (SZKLARCZYK et al., 2017), revelou que as mesmas estão associadas com diferentes proteínas, mas cujas funções biológicas (celulares) são essencialmente as mesmas das proteínas alvos (Tabela 1, Tabela 2 e APÊNDICE J). Para a rede de interação das proteínas associadas à XAC3905 nota-se a presença majoritária de proteínas que compõem o divisoma, enquanto para XAC1934 a interação é majoritária com proteínas do flagelo.

Na tentativa de se compreender o quão impactante é esta baixa identidade de resíduos apresentados na figura 9 e se as diferenças das proteínas que compõem a rede de interações (Tabela 1 e Tabela 2) seriam decorrentes de mudanças na conformação estrutural das proteínas, uma análise *in silico* foi feita usando-se o programa Phyre2 (KELLY et al., 2015). Os resultados mostraram que, apesar de apresentarem funções biológicas distintas, reduzido grau de identidade e distinta rede de interação proteica, ambas proteínas apresentam similar conformação estrutural (Figura 10).

Utilizando a ferramenta DELTA-BLAST (BORATYN et al., 2012) para analisar a sequência de XAC1934, observamos que esta apresenta maior *hit* com FleN (APÊNDICE K, p. 55 e Figura 11). Comparando a FleN de *V. cholerae* por DELTA-BLAST (APÊNDICE L, p. 55) com a ORF XAC1934, verificamos que ambas apresentam os mesmos domínios, incluindo o domínio FleN. Todas estas análises preliminares nos levaram a selecionar XAC1934 como um excelente alvo de estudo funcional.

Tabela 1 - Análise da composição dos domínios de XAC3905 seguido de análise por rede de interação proteína-proteína. As cores das linhas nas redes de interação representam: verde – vizinhança genômica, vermelho – fusão gênica, azul – coocorrência gênica, magenta – descrição textual, preto – coexpressão gênica ou proteica e azul claro – homologia.

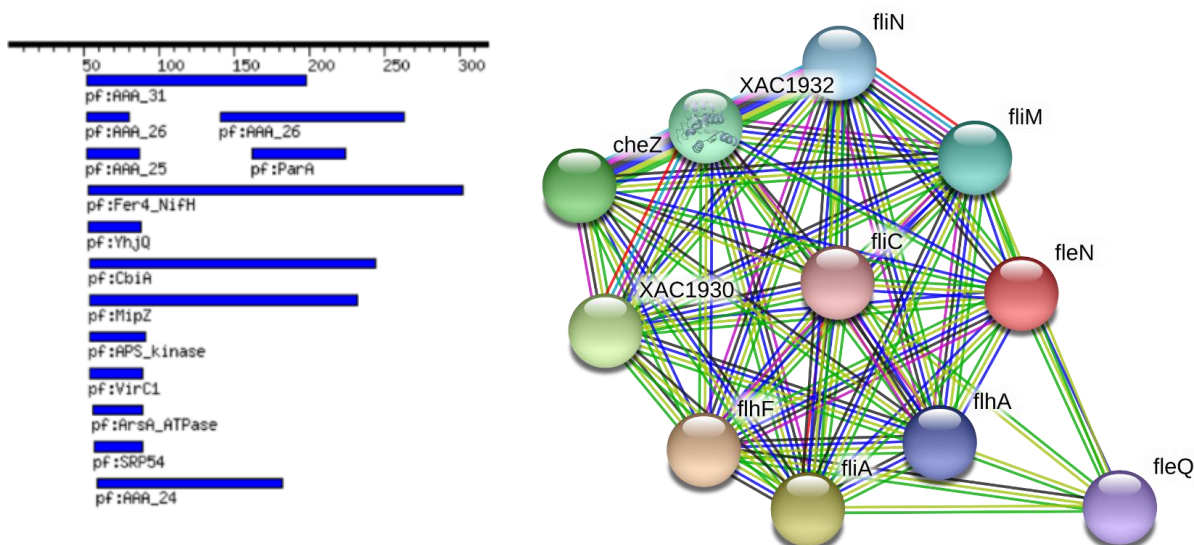


Nó	Acesso	Anotação
XAC0192	XAC0192	<i>Proteína de partição; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.</i>
XAC2433	XAC2433	<i>Resolvase; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.</i>
XAC3904	XAC3904	<i>Proteína não caracterizada; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.</i>
XAC3905	XAC3905	<i>Proteína de partição cromômica; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.</i>
XACa0018	XACa0018	<i>Proteína de partição A; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.</i>
amy	XAC0798	<i>Alfa-amilase; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.</i>
dnaA	XAC0001	<i>Proteína iniciadora de replicação cromossomal DnaA; Desempenha uma função importante na iniciação e regulação da replicação cromossomal. Liga-se à origem de replicação; liga-se especificamente à fita dupla de DNA em um consenso de 9 pb (dnaA box)- 5'-TTATC[CA]A[CA]A-3'. DnaA se liga ao ATP e aos ácidos fosfolipídicos.</i>
ftsK	XAC2006	<i>DNA translocase FtsK; Proteína essencial de divisão celular que coordena a divisão celular e segregação cromossômica. A região N-terminal está envolvida na montagem da maquinaria de divisão celular. A região C-terminal funciona como um motor de DNA que move o dsDNA de uma forma dependente de ATP para o sitio de recombinação dif, que está localizado dentro da região terminadora de replicação. A translocação para especificamente nos sitios Xer-dif, onde FtsK interage com a Xer recombinase, permitindo a ativação da desnaturação do cromossomo pela recombinação. Sequências polare que orientam a FtsK (KOPS) guiam a direção do DNA transl [...]</i>
mcrB	XAC3907	<i>Proteína de resistência a Mitomicina; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.</i>

<i>parB</i>	XAC3906	Proteína de partição cromossômica; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark; Pertence à família ParB.
<i>wbnF</i>	XAC3908	Epimerase do açúcar nucleotídico; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.

Fonte: dado da pesquisa.

Tabela 2 - Análise da composição dos domínios de XAC1934 seguido de análise por rede de interação proteína-proteína. As cores das linhas nas redes de interação representam: verde – vizinhança genômica, vermelho – fusão gênica, azul – coocorrência gênica, magenta – descrição textual, preto – coexpressão gênica ou proteica e azul claro – homologia.

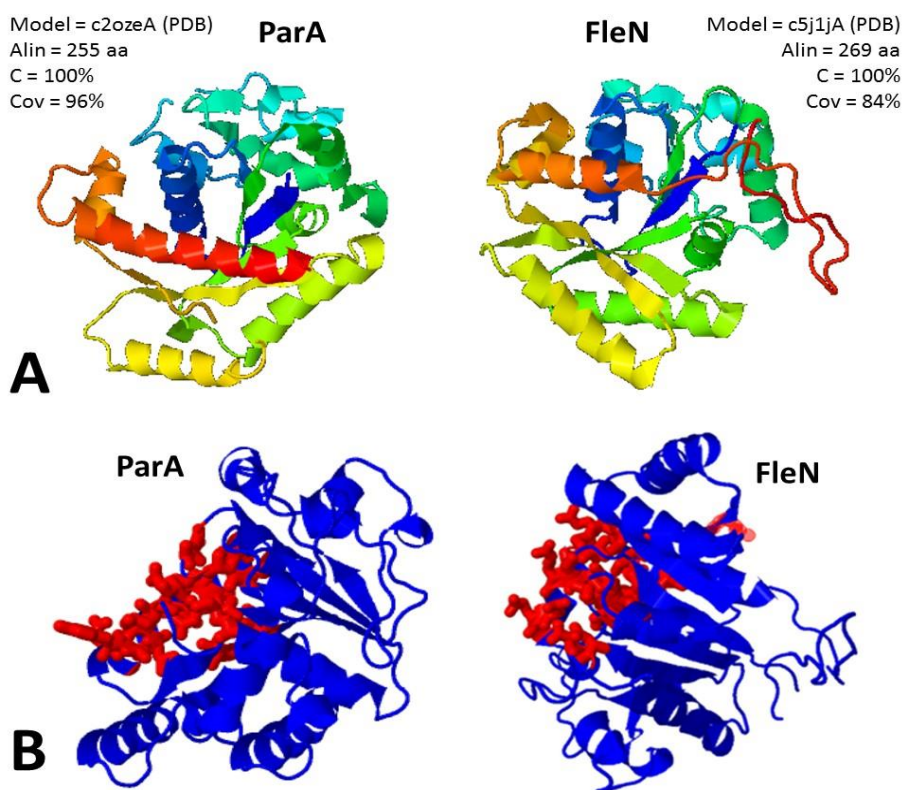


Nó	Acesso	Anotação
XAC1930	XAC1930	Proteína relacionada com quimitaxia; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.
XAC1932	XAC1932	Proteína de quimitaxia; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.
<i>cheZ</i>	XAC1931	Fosfatase CheZ; Desempenha uma importante função na via de sinal de transdução quimiotático bacteriano, acelerando a defosforilação da CheY fosforilado (CheY-P).
<i>fleN</i>	XAC1934	Proteína determinadora de sitio; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark; Pertence à família das ParAs.
<i>fleQ</i>	XAC1967	Regulador transcricional; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.
<i>flhA</i>	XAC1936	Proteína de biossíntese flagelar FlhA; Requerida para formação de estruturas de bastonete do aparato flagelar. Juntamente com FliI e FliH, pode constituir a maquinaria de exportação da flagelina.
<i>flhF</i>	XAC1935	Proteína flagelar; Identificada por similaridade de sequência; putativa; ORF localizada por Blastx/Glimmer/Genemark.
<i>fliA</i>	XAC1933	Fator sigma da RNA polimerase FliA; Fatores sigma são fatores de iniciação que promovem a ligação da RNA polimerase ao sitio específico de iniciação para serem liberados posteriormente. Este fator sigma controla a expressão dos genes relacionados ao flagelo.
<i>fliC</i>	XAC1975	Flagelina; Flagelina é a subunidade proteica que polimeriza a formação dos filamentos do flagelo bacteriano.
<i>fliM</i>	XAC1947	Proteína switch do motor flagelar FliM; FliM é uma das três proteínas (FliG, FliN, FliM) que forma o complexo switch do rotor montado (C ring), localizado na base do corpo basal. Este complexo interage com

		<i>CheY</i> e <i>CheZ</i> proteínas quimiotáticas, além de contatar componentes do motor que determinam a direção da rotação flagelar.
<i>fliN</i>	XAC1946	Proteína switch do motor flagelar <i>FliN</i> ; <i>FliN</i> é uma das três proteínas (<i>FliG</i> , <i>FliN</i> , <i>FliM</i>) que forma o complexo switch do rotor montado (<i>C ring</i>), localizado na base do corpo basal. Este complexo interage com <i>CheY</i> e <i>CheZ</i> proteínas quimiotáticas, além de contatar componentes do motor que determinam a direção da rotação flagelar.

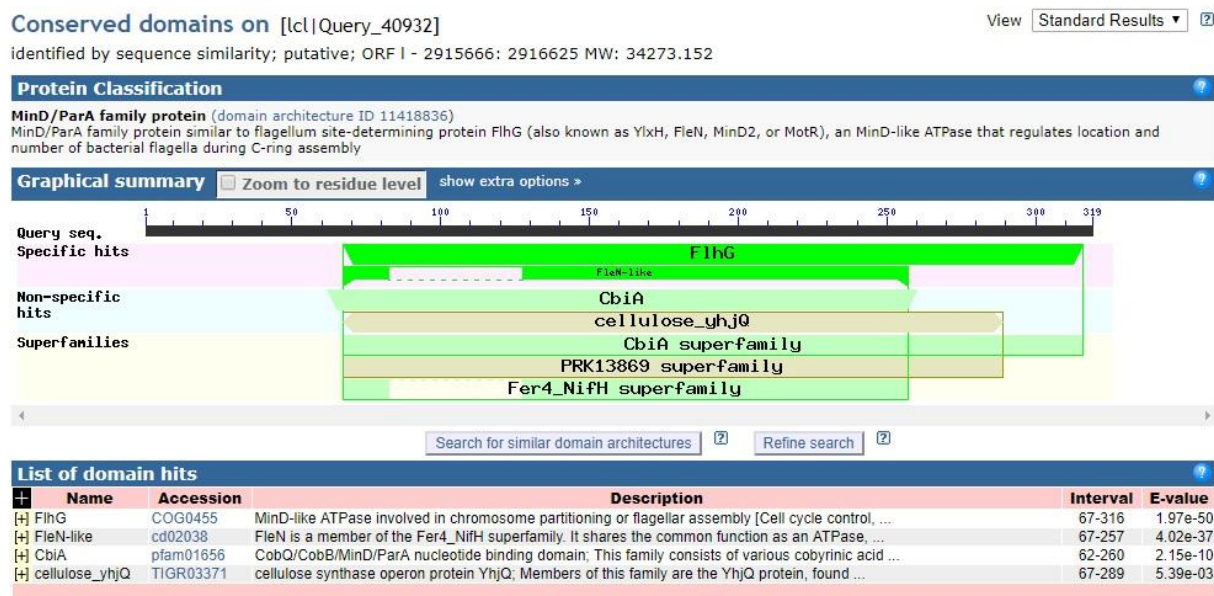
Fonte: dado da pesquisa.

Figura 10 - Análise da conformação estrutural de ParA e FleN de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Nota-se que as estruturas são muito similares (A) mantendo inclusive as mesmas composições dos bolsos catalíticos (pockets) em vermelho (B).



Fonte: dado da pesquisa.

Figura 11 - Domínios dos *hits* apresentados pela sequência de amino ácidos da ORF XAC1934 na análise por DELTA-BLAST.

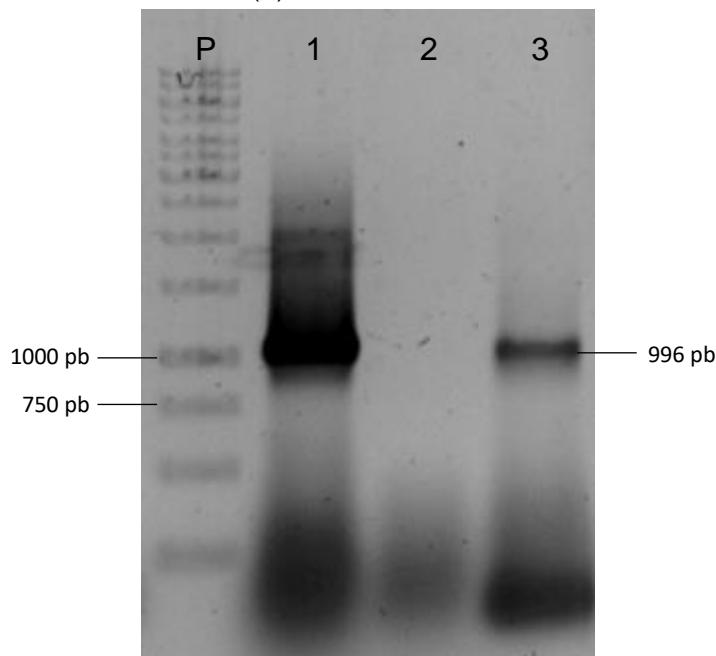


Fonte: dado da pesquisa.

4.2 Expressão de XAC1934 por *X. citri*

Para que pudéssemos verificar a expressão inata da ORF XAC1934 por *X. citri*, executamos o experimento de RT-PCR no qual é possível verificar que ocorre a expressão natural na fase log de crescimento de *X. citri*. Como pode-se observar na figura 12, na qual é possível observar a presença da banda correspondente ao fragmento desta ORF (996 pb) no RT, indicando-nos que houve a conversão do RNAm (mensageiro) da ORF em cDNA (fita de DNA complementar ao RNAm) por RT-PCR que, por sua vez, foi convertido em DNA de fita dupla por PCR convencional.

Figura 12 - Gel de agarose 0,7% do RT-PCR de *fleN* (996 pb) (3), extração de RNA total de *X. citri* contaminada com DNAg (1), extração de RNA após tratamento com DNase (2) e padrão de tamanho molecular (P).

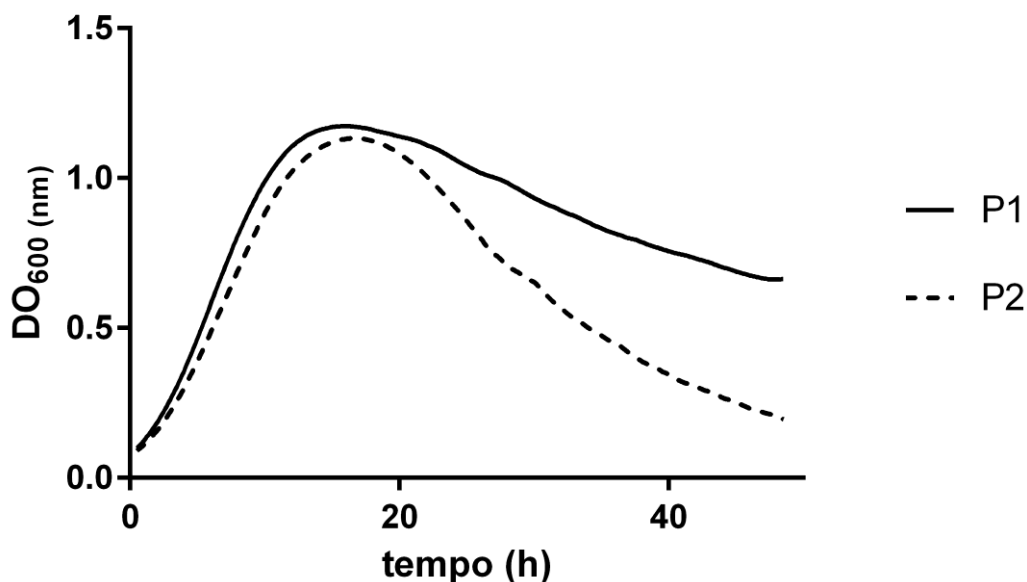


Fonte: dado da pesquisa.

4.3 Ausência de localização da proteína de XAC1934 e interferência na formação do septo divisional em *X. citri*

A transformação feita em *X. citri* com pKUS4 e resultante mutante de deleção $\Delta fleN_{XAC1934}$ para posterior observação em microscopia de fluorescência não modificou drasticamente seu padrão de crescimento em relação à *X. citri* selvagem (Figura 13). É possível verificar que o mutante apresentou apenas uma maior aceleração na sua fase de morte celular com uma velocidade específica de morte máxima (μ_{max}) de $-0,158 \text{ h}^{-1}$, enquanto que a selvagem apresentou um μ_{max} de $-0,135 \text{ h}^{-1}$ (SCHMIDELL et al.,), evidenciando que não se trata de um gene essencial ao crescimento de *X. citri*.

Figura 13 - Gráfico das médias dos padrões de crescimento observados pela *X. citri* selvagem (P1) e o mutante $\Delta fleN_{\chi AC1934}$ (P2).



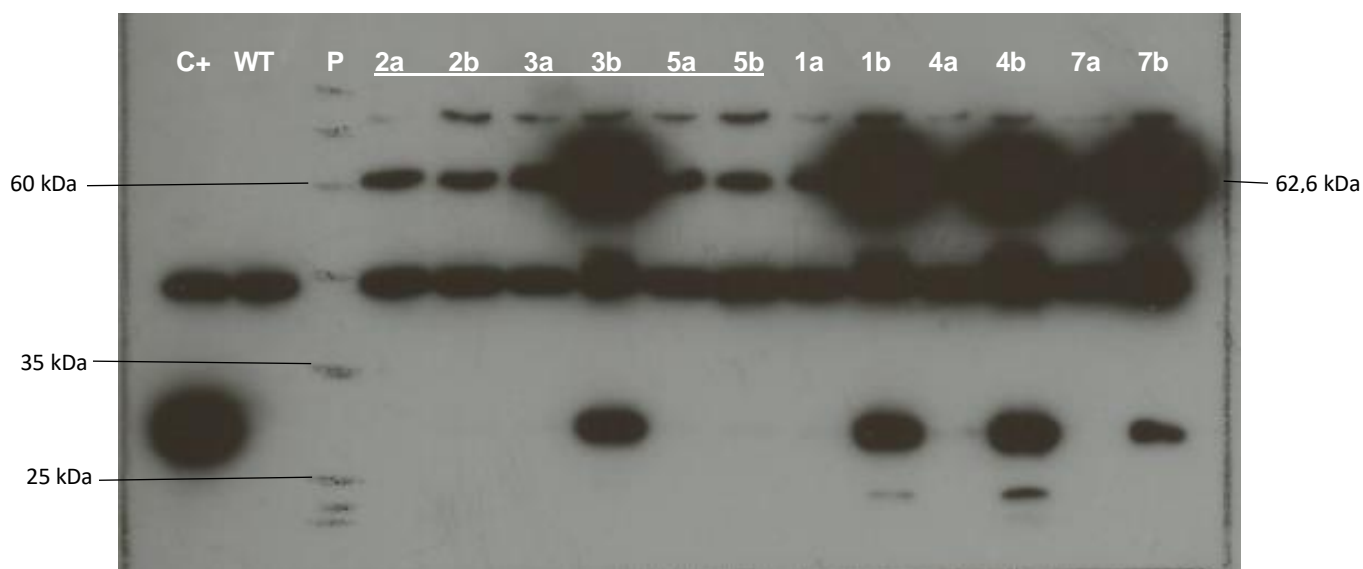
Fonte: dado da pesquisa.

Para que lográssemos uma certeza na observação da proteína correta marcada com GFP em microscopia de fluorescência, verificamos sua devida expressão através experimento de Westrn-Blot (Figura 14), no qual pode-se observar que os mutantes com integração de pKUS2 no *locus* da ORF e em *amy* apresentam uma expressão adequada pela presença da banda correspondente à massa molecular da fusão proteica FleN-GFP (62,6 kDa). Todavia, não há uma regulação precisa do promotor induzido por arabinose, pois há a presença da banda correspondente à fusão proteica antes da indução. Porém, os mutantes com integração plasmidial no *locus* da ORF, com exceção do mutante número 3, apresentaram níveis de expressão esperados, assim como os mutantes com integração em *amy*.

A microscopia de fluorescência com o mutante expressando FleN-GFP (*amy*::pKUS2) (Figura 15) revelou que não há uma localização subcelular de FleN em *X. citri* por não apresentar nenhum foco de fluorescência nas microscopias observadas, mas sim uma fluorescência dispersa por toda a célula como pode-se verificar na figura 15C com a sobreposição das camadas de contraste de fase e fluorescência. Este resultado nos sugere que FleN de *X. citri* não estaria associada à localização flagelar como descrito por Kazmierczak e colaboradores (2008; 2013) em

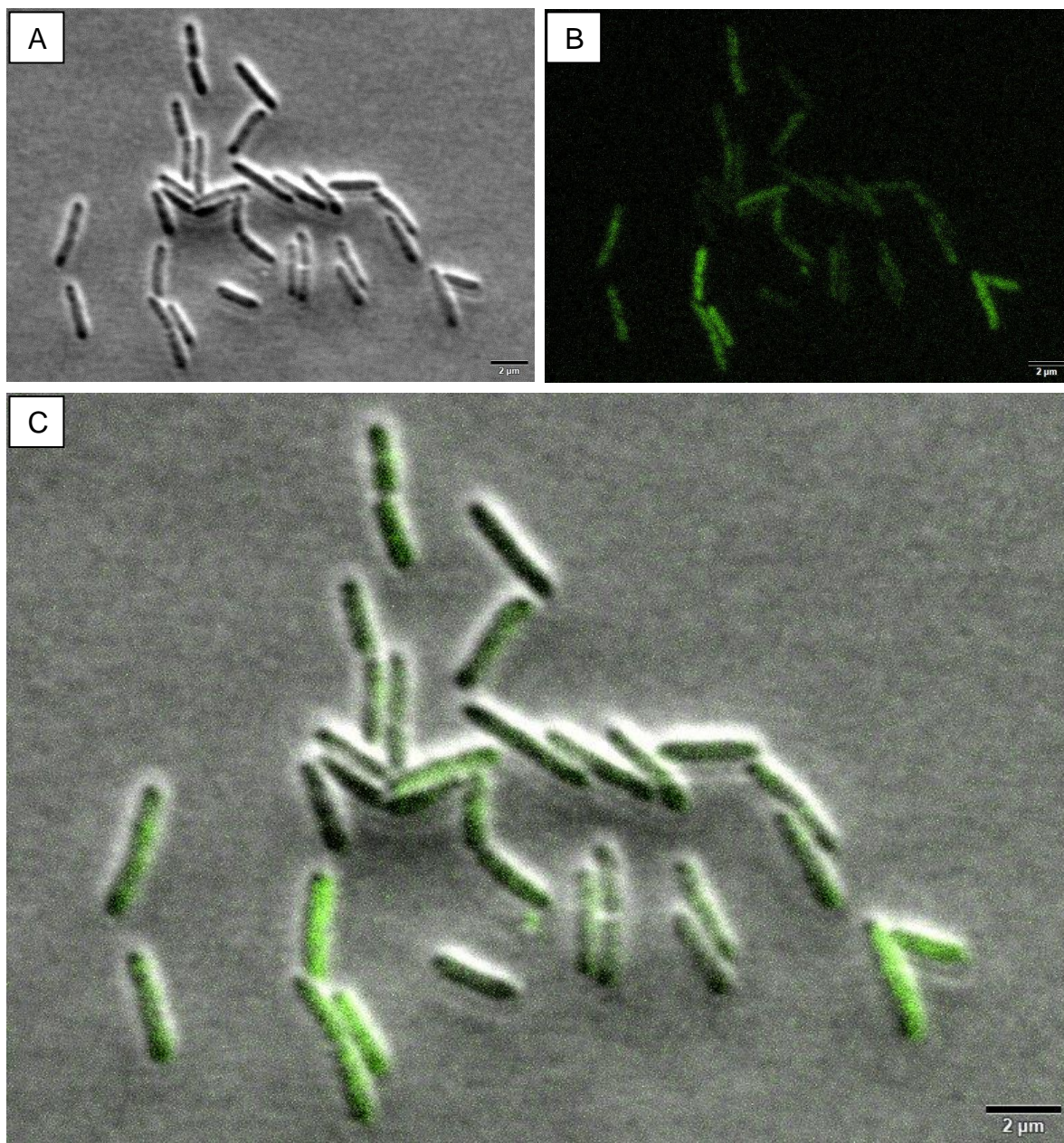
V. alginolyticus, pois, em seu estudo, esta proteína apresenta interação com a atividade GTPásica de FlhF neste micro-organismo.

Figura 14 - Western-Blot dos mutantes XAC1934::pKUS2 e *amy*::pKUS2 expressando FlhN-GFP (62,612 kDa). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* contendo pGCD21 (C+), *X. citri* selvagem (WT), padrão de massa molecular (P), mutantes com integração no *locus* da ORF (sublinhados), mutantes com integração em *amy* (não sublinhados) antes da indução (a), depois da indução (b), mutantes (número).



Fonte: dado da pesquisa.

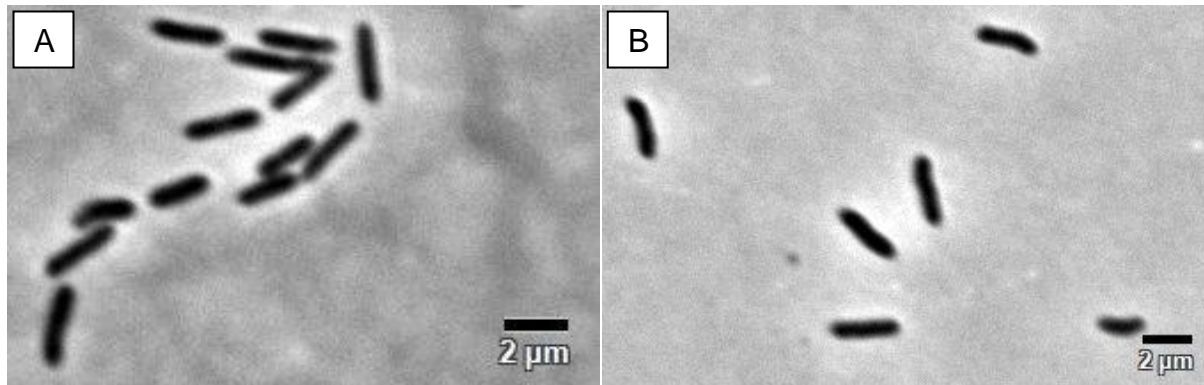
Figura 15 – Microscopia de fluorescência com o mutante de FleN-GFP com aumento de 100X em contraste de fase (A), fluorescência de GFP (B) e sobreposição destas duas camadas (C).



Fonte: dado da pesquisa.

Com a finalidade de verificar se FleN de *X. citri* estaria associada com a localização da formação do anel MS (membrana/supramembrana), estrutura flagelar, que inibiria a formação do septo no polo celular (KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013), fizemos a microscopia de contraste de fase com o mutante deletado ($\Delta fleN_{XAC1934}$) e *X. citri* WT (Figura 16). Tal experimento nos revelou que não há interferência de FleN de *X. citri* com a localização da formação do septo, pois nenhuma minicélula foi observada nos mutantes e os comprimentos celulares apresentaram uma média de 2,65 μm em *X. citri* WT e 2,63 μm em $\Delta fleN_{XAC1934}$. Sabendo-se que se tratam de dados normais pelo teste de Shapiro-Wilk, estes apresentaram um valor p do teste t de 0,74, sendo bem maior que 0,05, ou seja, não havendo diferença significativa entre as médias. Portanto, divergindo do estudo em *C. jejuni* realizado por Balaban e Hendrixson (2011). Este resultado em *X. citri* apresenta o mesmo padrão observado no trabalho feito por Kazmierczak e Hendrixson (2013) em *P. aeruginosa* que também não apresentou minicélulas em seu mutante.

Figura 16 – Microscopia de contraste de fase com aumento de 100X de *X. citri* WT (A) e do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ (B).



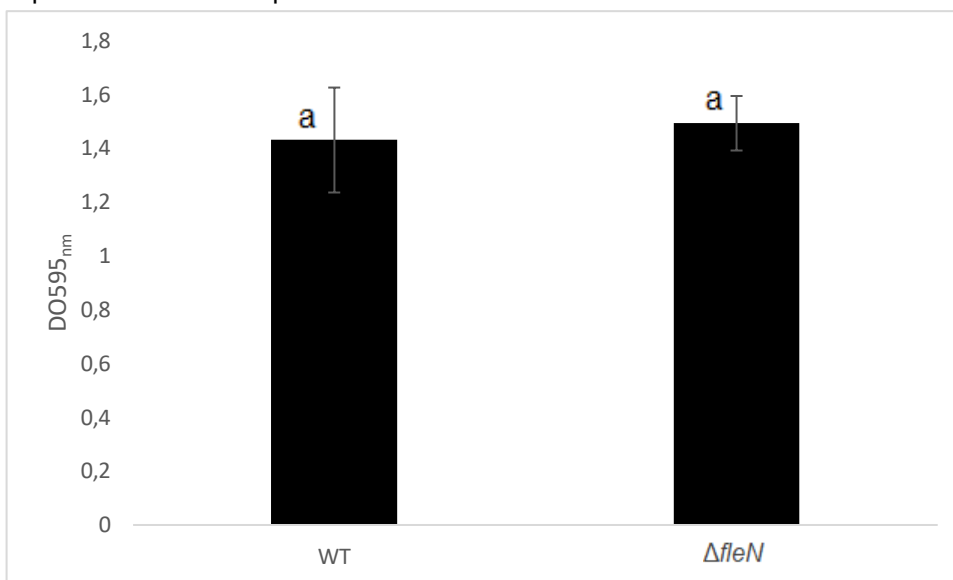
Fonte: dado da pesquisa.

4.4 XAC1934 não interfere na formação de biofilme de *X. citri*

Com a finalidade de verificar se XAC1934 estaria relacionada à formação de biofilme evidenciado por Malamud e colaboradores (2011), realizamos o experimento de biofilme (Gráfico 1) que nos revelou que a deleção da ORF não acarreta em mudanças na formação de biofilme em *X. citri* como previsto para outros genes relacionados à motilidade (MALAMUD et al., 2011). A média da leitura da $DO_{595\text{nm}}$ de *X. citri* WT foi de 1,43 e do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ foi de 1,49, com um valor p de 0,74

do teste t, uma vez que se tratam de dados normais pelo teste de Shapiro-Wilk, o que nos revela uma diferença não significativa por ser um valor bem acima de 0,05.

Gráfico 1 – Médias das leituras das DO_{595nm} do teste de biofilme corado com cristal violeta do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ ($\Delta fleN$) e de *X. citri* selvagem (WT). Barras representam o desvio padrão das leituras.

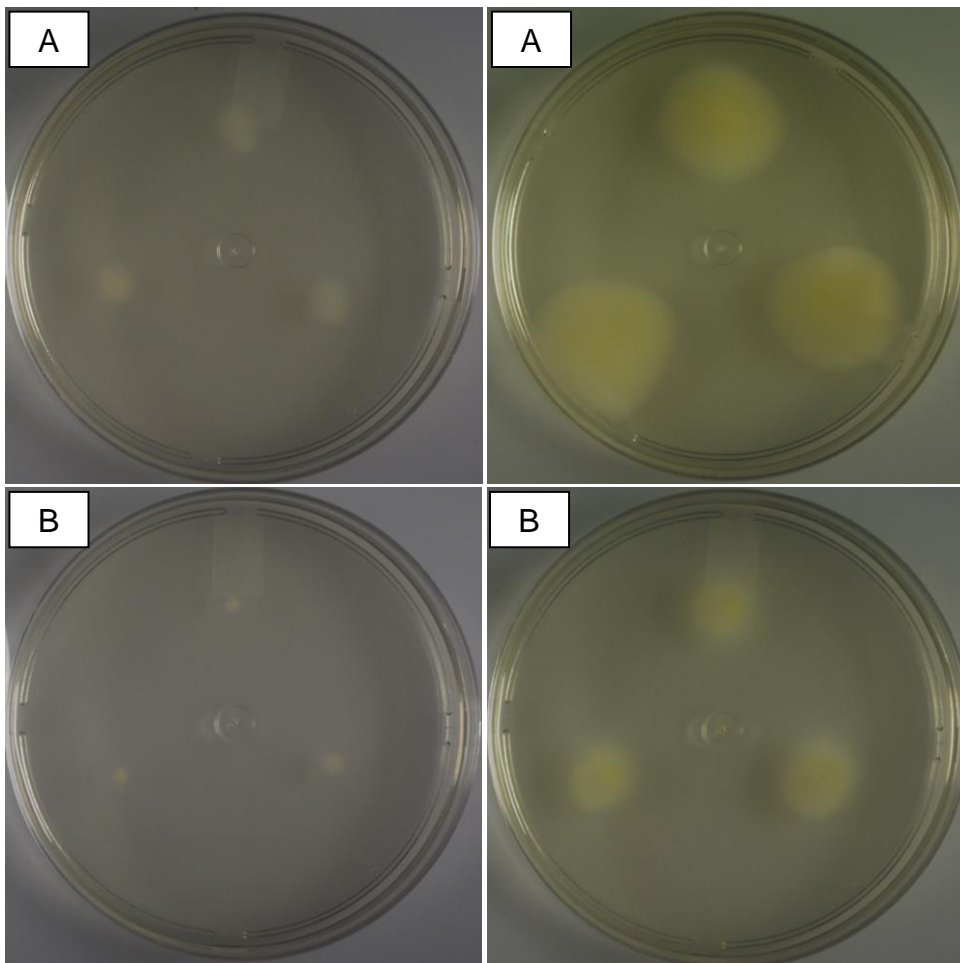


Fonte: dado da pesquisa.

4.5 Interferência de XAC1934 com motilidade de *X. citri*

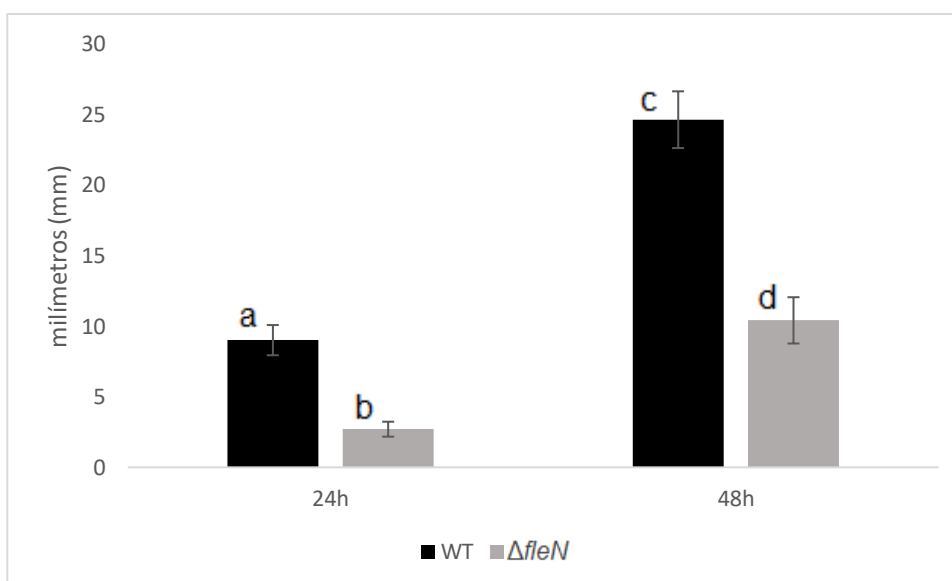
Como pode-se ver na figura 17, FleN se mostrou essencial para a motilidade de *X. citri* uma vez que o mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ apresentou uma formação de halo de 2,9 mm em média e em *X. citri* WT de 9,23 mm nas primeiras 24 horas de incubação. Essa diferença aumentou após 48 horas de incubação, em que o mutante apresentou um halo de 10 mm em média e *X. citri* WT de 25,5 mm (Gráfico 2). Sabendo-se que os dados são normais pelo teste de Shapiro-Wilk, fizemos o teste de Tukey que comprovou a diferença significativa, pois, com uma DMS (diferença mínima significativa) de 3,33, a diferença entre as médias de *X. citri* WT e do mutante foi de 6,33 no tempo de 24 horas e de 15,5 para o tempo de 48 horas. Este resultado corrobora o estudo de Correa, Peng e Klose (2005), no qual *V. cholerae* perde seu potencial de natação ao se deletar *flhG* (homólogo à *fleN*).

Figura 17 – Placas de NYGb apresentando os halos de motilidade de *X. citri* selvagem (A) e do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ (B) após 24 horas (1) e 48 horas (2) de incubação.



Fonte: dado da pesquisa.

Gráfico 2 – Média dos diâmetros da formação dos halos de motilidade medidos em milímetros da *X. citri* selvagem (WT) e do mutante de *fleN* ($\Delta fleN$) após 24 e 48 horas de incubação. Barras representam o desvio padrão das medidas.

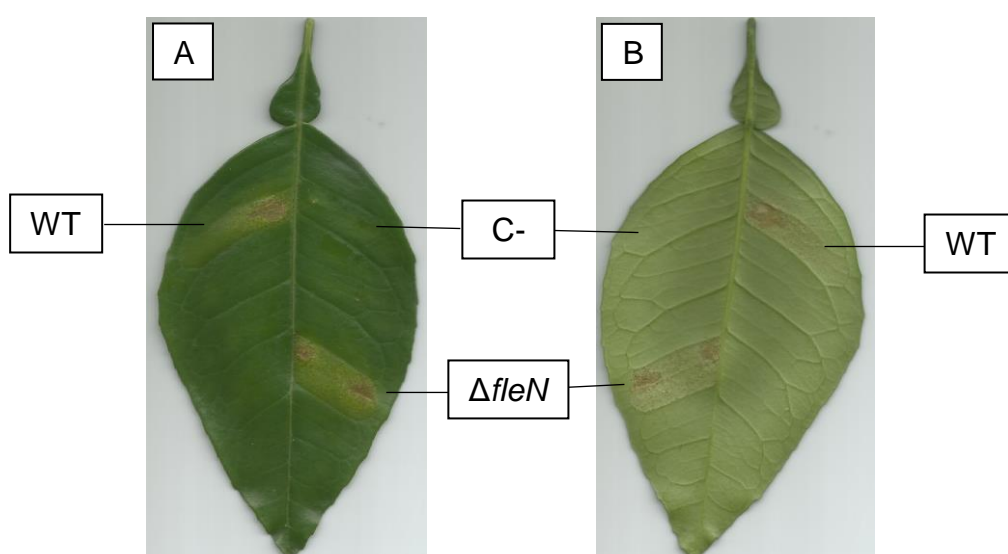


Fonte: dado da pesquisa.

4.6 XAC1934 não altera a patogenicidade de *X. citri*

Para averiguarmos se a ausência da ORF teria relação com a perda de fitopatogenicidade, foi realizado teste de infiltração. Como pode ser observado na figura 18, não houve alteração detectada no mutante devido à formação de pústulas, sintomas característicos das lesões ocasionadas por *X. citri*, em ambas regiões foliares: contendo o mutante e *X. citri* selvagem.

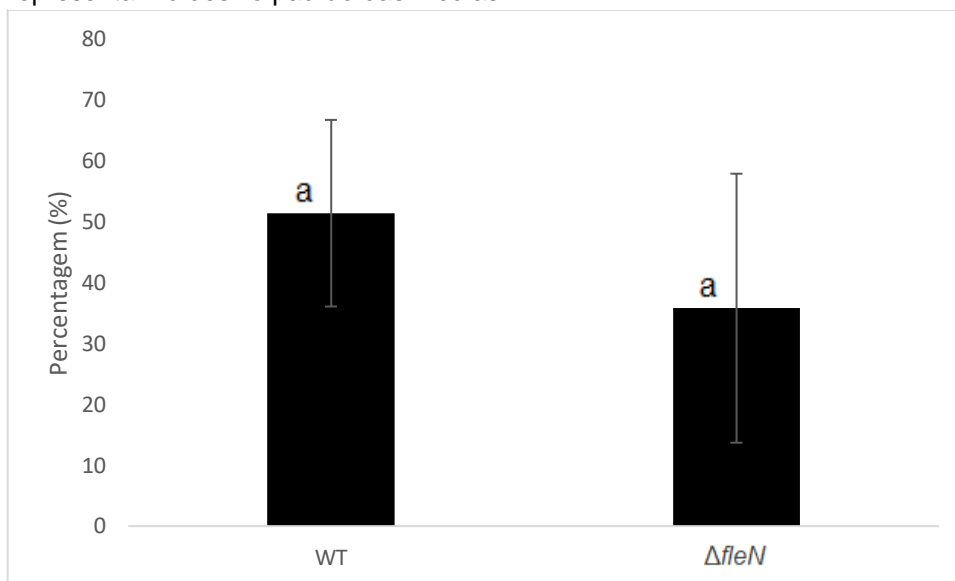
Figura 18 – Teste de fitopatogenicidade da *X. citri* selvagem (WT) e do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ ($\Delta fleN$) visto pela face adaxial (A) e abaxial (B). Controle negativo com salina estéril (C-).



Fonte: dado da pesquisa.

Visto que os dados são normais pelo teste de Shapiro-Wilk, o teste t revelou que não há uma diferença significativa entre as porcentagens de incidência de *X. citri* WT e do mutante $\Delta fleN_{XAC1934}$ no teste de aspersão (Gráfico 3), por apresentar um valor de p de 0,37 (muito superior a 0,05). Porém, o mutante revelou um potencial de diminuição da incidência da bactéria já que a média de *X. citri* WT foi de 51,42% e do mutante de 35,81%. A não significância do resultado obtido se deve à grande amplitude do desvio padrão uma vez que o mutante apresentou desde 16,66% a 60% de incidência e *X. citri* selvagem de 33,85% a 62,07%.

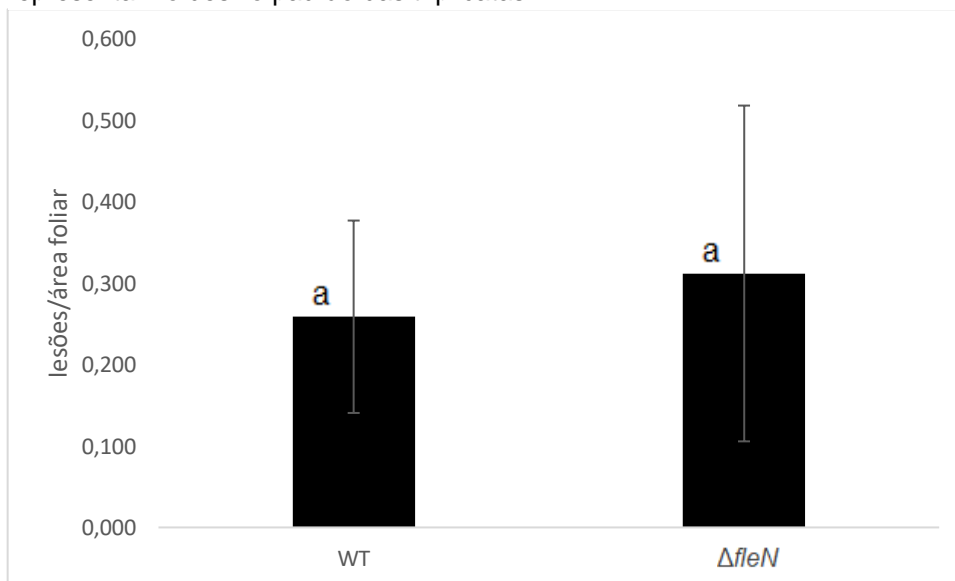
Gráfico 3 - Porcentagem de incidência nas folhas da laranja doce Pera Rio aspergida com *X. citri* selvagem (WT) e mutante de *fleN* ($\Delta fleN$). Barras representam o desvio padrão das médias.



Fonte: dado da pesquisa.

Comprovada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, fizemos o cálculo de severidade que também não apresentou diferença significativa entre os valores de severidade de *X. citri* WT e do mutante deletado, pois apresentou um valor p de 0,73 (muito superior a 0,05). Porém, também vemos uma tendência de aumento da severidade com a deleção de *fleN* (Gráfico 4).

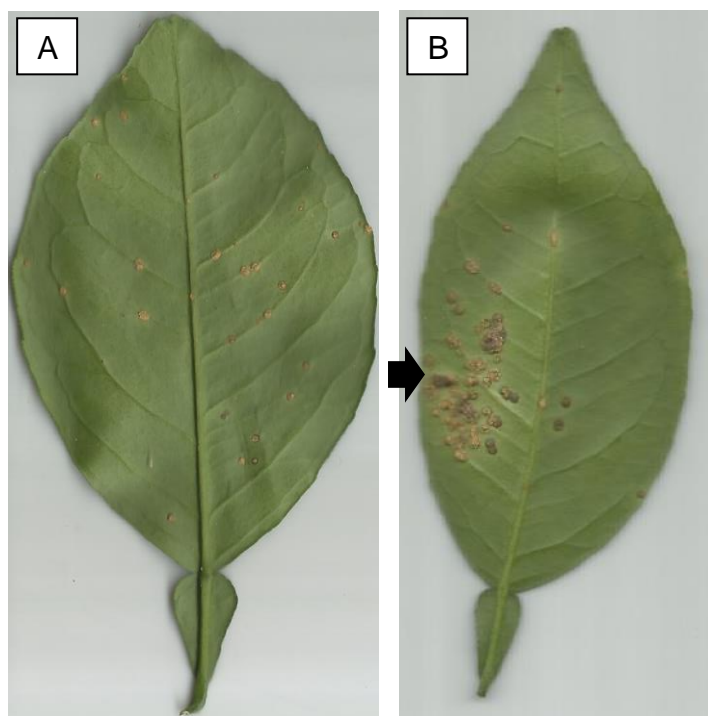
Gráfico 4 – Taxa de severidade dado por lesões por área foliar de laranja doce Pera Rio aspergida com *X. citri* selvagem (WT) ou mutante de *fleN* ($\Delta fleN$). Barras representam o desvio padrão das triplicatas.



Fonte: dado da pesquisa.

Esses resultados nos sugerem que, talvez, a deleção de *fleN* prejudique a natação da bactéria fazendo com que esta não consiga apresentar uma motilidade eficiente na folha e infecte a primeira região de contato foliar como podemos observar na figura 19 em que há uma concentração em uma parte da folha de laranjeira que estava presente em 10,34% das observações. O que corroboraria o estudo de Correa, Peng e Klose (2005) em *V. cholerae* em que o mutante de deleção de *fleN* apresentou uma diminuição de dez vezes na sua taxa de infecção, mas mantendo a virulência por permanecer com as medidas de liberação de toxinas.

Figura 19 – Folhas de laranjeira doce Pera Rio aspergidas com *X. citri* WT (A) e $\Delta fleN_{XAC1934}$ (B) após 30 dias em casa de vegetação. Região concentrada com lesões (flecha preta).



Fonte: dado da pesquisa.

5 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados revelam uma faceta até então desconhecida sobre a motilidade em *X. citri*, que sugerem o envolvimento do produto da ORF XAC1934 com a motilidade neste micro-organismo. Levando-nos a concluir que esta ORF seria a homóloga de *fleN* de *V. cholerae* e *P. aeruginosa*.

Por meio de análises *in silico*, verificamos que há uma grande homologia da ORF XAC1934 com *fleN* de outros micro-organismos, corroborando nossa visão de que *parAs* apresentam função de motilidade também em *X. citri*, sendo naturalmente expressa em sua fase log do crescimento. Estes resultados foram constatados com o experimento de motilidade que provaram a essencialidade do produto desta ORF para tal fenótipo.

Embora a microscopia de fluorescência não tenha apresentado localização subcelular em *X. citri*, evidenciando a ausência de sua participação na localização flagelar e interferência na formação do septo divisional, o mutante apresentou uma potencial alteração em sua infecção *in planta* com o experimento de aspersão, sugerindo a essencialidade da motilidade bacteriana no processo de infecção por *X. citri*.

O experimento de biofilme relevou que *fleN* de *X. citri* não apresenta relação com a formação do biofilme neste micro-organismo. Não obstante, este gene mostrou ser um potencial alvo para novos antimicrobianos a serem testados contra o cancro cítrico.

Contudo, experimentos de microscopia eletrônica de transmissão devem ser feitos com a finalidade de verificar a presença de células multiflageladas como observado em *V. cholerae* (CORREA; PENG; KLOSE, 2005) e *P. aeruginosa* (DASGUPTA; ARORA; RAMPHAL, 2000). Como também a verificação de possível interação de *FleN* com o DNA genômico (KAZMIERCZAK; HENDRIXSON, 2013) e alteração no nível de expressão da classe II dos genes flagelares (PROUTY; CORREA; KLOSE, 2001).

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUP, S. F.; GISH, W.; PENNSYLVANIA, T.; PARK, U. Basic Local Alignment Search Tool. p. 403–410, 1990.
- AMARAL, A. M. Do. **Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo** *Comunicado Técnico 86*. [s.l: s.n.].
- BALABAN, M.; HENDRIXSON, D. R. Polar flagellar biosynthesis and a regulator of flagellar number influence spatial parameters of cell division in campylobacter jejuni. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, p. 18–25, 2011.
- BARAQUET, C.; HARWOOD, C. S. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18478–18483, 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1318972110>>.
- BARTOSIK, A. A.; MIERZEJEWSKA, J.; THOMAS, C. M.; JAGURA-BURDZY, G. ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilizes the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. **Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 1080–1092, 2009.
- BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; MINSAVAGE, G. V.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4089–4096, 2011.
- BEHLAU, F.; HONG, J. C.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H. Evidence for Acquisition of Copper Resistance Genes from Different Sources in Citrus-Associated *Xanthomonads*. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 409–418, 2013. Disponível em: <<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-06-12-0134-R>>.
- BEHLAU, F.; SALA, I.; BEOZZO BASSANEZI, R. **Cancro cítrico: medidas essenciais de controle** *Manual Técnico*. [s.l: s.n.].
- BELASQUE JUNIOR, J.; BARBOSA, J. C.; BERGAMIN FILHO, A.; MASSARI, C. A. Prováveis consequências do abrandamento da metodologia de erradicação do cancro cítrico no Estado de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 5, p. 314–317, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-56762010000500007&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>.
- BELASQUE JUNIOR, J.; BERGAMIN FILHO, A.; BEOZZO BASSANEZI, R.; BARBOSA, J. C.; GIMENES FERNANDES, N.; TAKAO YAMAMOTO, P.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; PEREIRA LEITE JUNIOR, R.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 137–145, 2009.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, p. 101–111, 1957.

BOCH, J.; BONAS, U. Xanthomonas AvrBs3 Family-Type III Effectors: Discovery and Function. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p. 419–436, 2010. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-phyto-080508-081936>>.

BORATYN, G. M.; SCHÄFFER, A. A.; AGARWALA, R.; ALTSCHUL, S. F.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. **Biology Direct**, v. 7, p. 1–14, 2012.

BOSE, D.; JOLY, N.; PAPE, T.; RAPPAS, M.; SCHUMACHER, J.; BUCK, M.; ZHANG, X. Dissecting the ATP hydrolysis pathway of bacterial enhancer-binding proteins. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 1, p. 83–88, 2008. Disponível em: <<http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0360083>>.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA No 37, DE 5 DE SETEMBRO DE 2016. 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-prevencao/IN37_2016Cancroctrico.pdf/view>.

BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 21, DE 25 DE ABRIL DE 2018. 2018. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-prevencao/INMAPAn21_25.4.2018_Cancroctrico_statusfitossanitrio.pdf/view>.

BUSH, M.; DIXON, R. The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of σ^{54} -Dependent Transcription. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 497–529, 2012. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00006-12>>.

CHAGAS, M. C. M.; PARRA, J. R. P.; NAMEKATA, T.; HARTUNG, J. S.; YAMAMOTO, P. T. *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) and its relationship with the citrus canker bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 55–59, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ne/v30n1/16971.pdf%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1519-566X2001000100009&script=sci_arttext%5Cnhttp://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2001000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

CITRUS BR. MUNDO Exportações totais de suco de laranja em toneladas de FCOJ Equivalente e milhares de US\$ FOB. 2018a. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/download/Relatorio_ABRIL-2018_ano-safra.pdf>.

CITRUS BR. **Indústria deve processar 243,4 mi de caixas em 2018/19**. Disponível em: <<http://www.citrusbr.com/noticias/?id=312553>>. Acesso em: 15 jun. 2018b.

CORREA, N. E.; PENG, F.; KLOSE, K. E. Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 18, p. 6324–6332, 2005.

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

DASGUPTA, N.; ARORA, S. K.; RAMPHAL, R. fleN, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 2, p. 357–364, 2000.

DASGUPTA, N.; RAMPHAL, R. Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 22, p. 6636–6644, 2001.

DONOVAN, C.; SCHWAIGER, A.; KRÄMER, R.; BRAMKAMP, M. Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 13, p. 3441–3451, 2010.

ERRINGTON, J.; DANIEL, R. A.; SCHEFFERS, D.-J. Cytokinesis in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 52–65, 2003. Disponível em: <<http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.67.1.52-65.2003>>.

FERREIRA, H.; BARRIENTOS, F. J. A.; BALDINI, R. L.; ROSATO, B. Y. Electrotransformation of three pathovars of *Xanthomonas campestris*. p. 651–655, 1995.

FERREIRA, H.; BELASQUE JR., J. Workshop on *Xanthomonas citri*/ Citrus canker. 2011.

FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; MISTRY, J.; MITCHELL, A. L.; POTTER, S. C.; PUNTA, M.; QURESHI, M.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SALAZAR, G. A.; TATE, J.; BATEMAN, A. **The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future** *Nucleic Acids Research*, 2015. .

FUNDECITRUS. **Guia de fases de desenvolvimento vegetativo da planta de citros**. Disponível em:

<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/guia-de-fases-de-desenvolvimento-vegetativo-da-planta-de-citros/69>. Acesso em: 17 out. 2018.

FUNDECITRUS. **Ministério da Agricultura publica nova IN sobre cancro cítrico**.

Disponível em:

<<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/ministerio-da-agricultura-publica-nova-in-sobre-cancro-citrico/681>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

GOTTWALD, T. R.; PIERCE, F. Citrus Canker : The Pathogen and Its Impact. v. 1994, n. 74, p. 1–32, 2002.

GOTTWALD, T. R.; SUN, X.; RILEY, T.; GRAHAM, J. H.; FERRANDINO, F.; TAYLOR, E. L. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 361–377, 2002.

GUZZO, C. R.; DUNGER, G.; SALINAS, R. K.; FARAH, C. S. Structure of the PilZ-FimXEAL-c-di-GMP complex responsible for the regulation of bacterial type IV pilus biogenesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 12, p. 2174–2197, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.021>>.

HARRY, E.; MONAHAN, L.; THOMPSON, L. Bacterial Cell Division: The Mechanism and Its Precision. **International Review of Cytology**, v. 253, n. 06, p. 27–94, 2006.

HARSHITA; CHANCHAL; JAIN, D. Cloning, expression, purification, crystallization and initial crystallographic analysis of FleN from *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications**, v. 72, n. 2, p. 135–138, 2016. Disponível em: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S2053230X16000170>>.

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

KANEHISA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes** **KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs**, 2017. . Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw1092>>.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 310–347, 2009. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00041-08>>.

KAZMIERCZAK, B. I.; HENDRIXSON, D. R. Spatial and Numerical Regulation of Flagellar Biosynthesis in Polarly-Flagellated Bacteria. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 6, p. 788–802, 2013.

KELLY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C.; WASS, M.; STERNBERG, M. **The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis** **Nature Protocols** Nature Publishing Group, , 2015. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>>.

KOONIN, E. V. A Superfamily of ATPases with Diverse Functions and Deviant ATP-binding motif. **Journal of Molecular Biology**, 1993.

KRAISELBURD, I.; ALET, A. I.; TONDO, M. L.; PETROCELLI, S.; DAURELIO, L. D.; MONZÓN, J.; RUIZ, O. A.; LOSI, A.; ORELLANO, E. G. A LOV protein modulates the physiological attributes of *xanthomonas axonopodis* pv. *citri* relevant for host plant colonization. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

KRÓL, E.; BORGES, A. D. S.; SILVA, I.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D.-J. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. April, p. 1–12, 2015.

KUMAR, A.; ALAM, A.; RANI, M.; EHTESHAM, N. Z.; HASNAIN, S. E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 481–489, 2017.

KUSUMOTO, A.; SHINOHARA, A.; TERASHIMA, H.; KOJIMA, S.; YAKUSHI, T.; HOMMA, M. Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polarflagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*. **Microbiology**, v. 154, n. 5, p. 1390–1399, 2008.

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

LEIPE, D. D.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. **Journal of Molecular Biology**, v. 317, n. 1, p. 41–72, 2002.

LEONARD, T. A.; MOLLER-JENSEN, J.; LOWE, J. Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1455, p. 523–535, 2005.

Disponível em:

<<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.2004.1608>>.

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

LI, J.; WANG, N. The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC Microbiology**, v. 12, 2012.

LI, J.; WANG, N. Foliar Application of Biofilm Formation–Inhibiting Compounds Enhances Control of Citrus Canker Caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

Phytopathology, v. 104, n. 2, p. 134–142, 2014. Disponível em:

<<http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-04-13-0100-R>>.

LORENZONI, A. S. G.; DANTAS, G. C.; BERGSMA, T.; FERREIRA, H. *Xanthomonas citri* MinC Oscillates from Pole to Pole to Ensure Proper Cell Division and Shape. v. 8, n. July, p. 1–12, 2017.

MACNAB, R. M. HOW BACTERIA ASSEMBLE FLAGELLA. **Annu. Rev. Microbiol.**, p. 77–100, 2003.

MALAMUD, F.; CONFORTE, V. P.; RIGANO, L. A.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; MORAIS DO AMARAL, A.; VOJNOV, A. A. HrpM is involved in glucan biosynthesis, biofilm formation and pathogenicity in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 9, p. 1010–1018, 2012.

MALAMUD, F.; HOMEM, R. A.; CONFORTE, V. P.; MARCELO YARYURA, P.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; DO AMARAL, A. M.; VOJNOV, A. A. Identification and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. PART 9, p. 1911–1919, 2013.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, H. 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**, 2011. .

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE, J.; DO AMARAL, A. M.; TABOGA, S. R.; FERREIRA, H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: Targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 310, n. 1, p. 76–83, 2010.

MIERZEJEWSKA, J.; JAGURA-BURDZY, G. Prokaryotic ParA-ParB-parS system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. **Plasmid**, v. 67, n. 1, p. 1–14, 2012.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DE MORAES, F. E.; DE OLIVEIRA, J. C.; DE SOUZA, R. F.; FANCINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE, R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; RODRIGUES NETO, J.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA, H. A.; STASKAWICZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A.; SETUBAL, J. C. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 238, 2010. Disponível em: <<http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-238>>.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. p. 138, 2010. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf>.

PROUTY, M. G.; CORREA, N. E.; KLOSE, K. E. The novel sigma⁵⁴- and sigma²⁸-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 1595–1609, 2001.

RINGGAARD, S.; SCHIRNER, K.; DAVIS, B. M.; WALDOR, M. K. A family of ParA-like ATPases promotes cell pole maturation by facilitating polar localization of chemotaxis proteins. **Genes and Development**, v. 25, n. 14, p. 1544–1555, 2011.

ROY, R.; TIWARI, M.; DONELLI, G.; TIWARI, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 2018.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.: s.n.]

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. Systematic and applied microbiology*, v. 28, n. 6, p. 494–518, 2005.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 690–695, 2006.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. [s.l.: s.n.]

SGRO, G. G.; FICARRA, F. A.; DUNGER, G.; SCARPECI, T. E.; VALLE, E. M.; CORTADI, A.; ORELLANO, E. G.; GOTTIG, N.; OTTADO, J. Contribution of a harpin protein from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* to pathogen virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 9, p. 1047–1059, 2012.

SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; BELASQUE, J.; SACRAMENTO, L. V. S.; FERREIRA, H. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Supplementar material. **Journal of bacteriology**, v. 195, n. 1, p. SM, 2013.

SZKLARCZYK, D.; MORRIS, J. H.; COOK, H.; KUHN, M.; WYDER, S.; SIMONOVIC, M.; SANTOS, A.; DONCHEVA, N. T.; ROTH, A.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; VON MERING, C. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D362–D368, 2017.

THANBICHLER, M.; SHAPIRO, L. MipZ, a Spatial Regulator Coordinating Chromosome Segregation with Cell Division in *Caulobacter*. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 147–162, 2006.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON T.J. **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence writing, position specific gap penalties and weight matrix choice** **Nucleic Acid Research**, 1994. .

UCCI, A. P.; MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE, J.; FERREIRA, H. Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

MicrobiologyOpen, v. 3, n. 1, p. 29–41, 2014.

VAN HOUTT, R.; MICHIELS, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5–6, p. 626–633, 2005.

YAN, Q.; HU, X.; WANG, N. The novel virulence-related gene *nlxA* in the lipopolysaccharide cluster of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is involved in the production of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide, motility, biofilm formation and stress resistance. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 8, p. 923–934, 2012.

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 : MPMI, v. 25, n. 863, p. 1–72, 2011.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21899385>>.

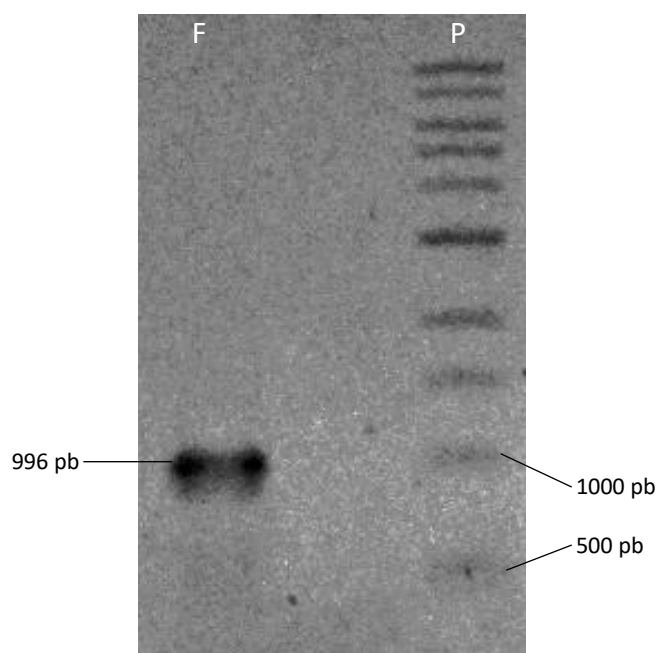
YONEKURA, K.; MAKI-YONEKURA, S.; NAMBA, K. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 191–197, 2002.

APÊNDICE A – Tabela dos primers utilizados para a amplificação dos fragmentos *fleN*, up34 e dn34.

Nome do primer	Sequência
fleN F (NheI)	AAAGCTAGCAGGAGGAAAGATCCATGCCAATGCCGCCAG TCTCGTTCTTCGC-3'
fleN R (XhoI)	TTTTCTCGAGTGCCGCCACTCCCCGTTGGATGATGC-3'
upXAC1934F2 (SpeI)	TACGCCAAGCTACGTAATACGACTCACTAGTGCTGATGCG GCAGATGATCGAGCGC-3'
upXAC1934R2 (BglII)	AAAAGATCTATCACGCGACTGCATGGTTGTGCTC-3'
downXAC1934F2 (BglII)	AAAAGATCTGAACGCATCATCCAACGGGGAGTG-3'
downXAC1934R2 (SpeI)	GCCGGCTTCAATTGCACGGGCCCCACTAGTACGTCGCAT CGTCGAGAAGTCGTCC-3'

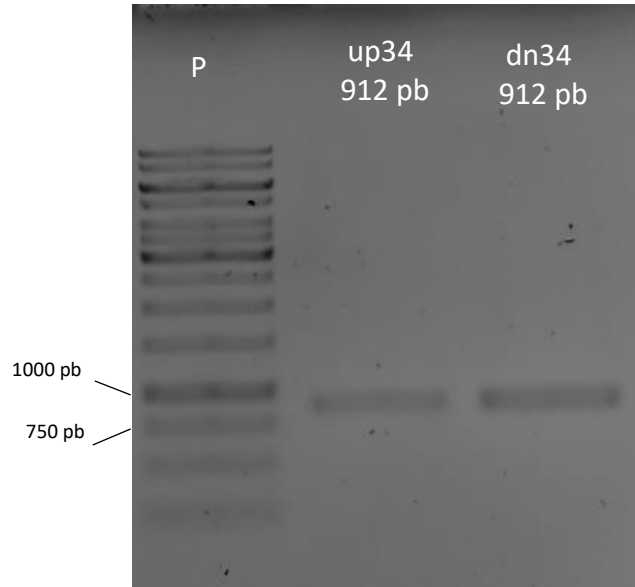
Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE B – Gel de agarose 0,7% com o PCR do fragmento de *fleN* (959 pb) (F), padrão de tamanho molecular (P).



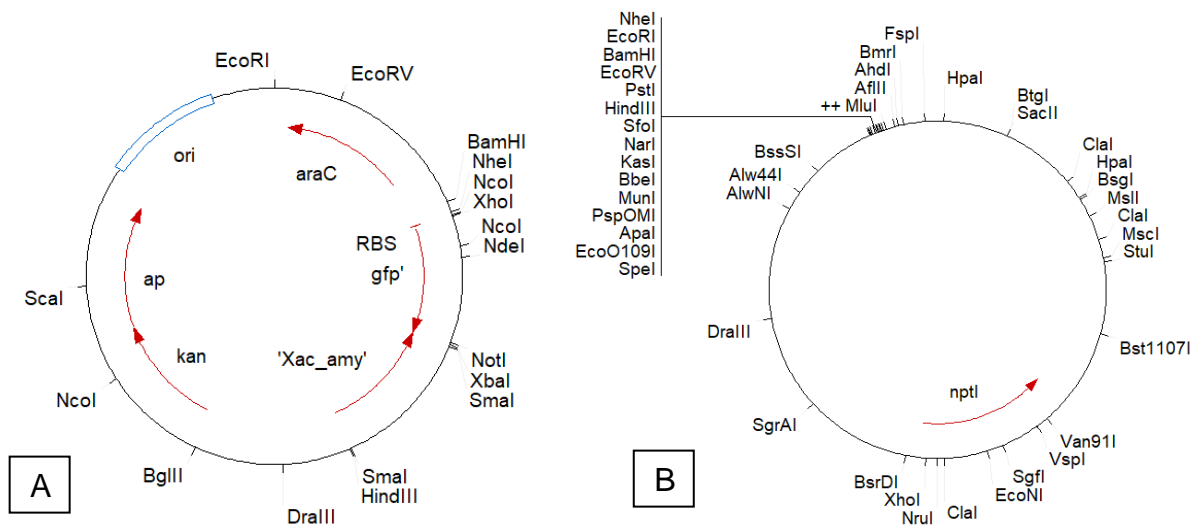
Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE C – Gel de agarose 0,7% com os PCRs dos fragmentos de DNA upstream de *fleN* (up34: XAC 2914884..2915755) e downstream de *fleN* (dn34: XAC 2916593..2917465), padrão de tamanho molecular (P).



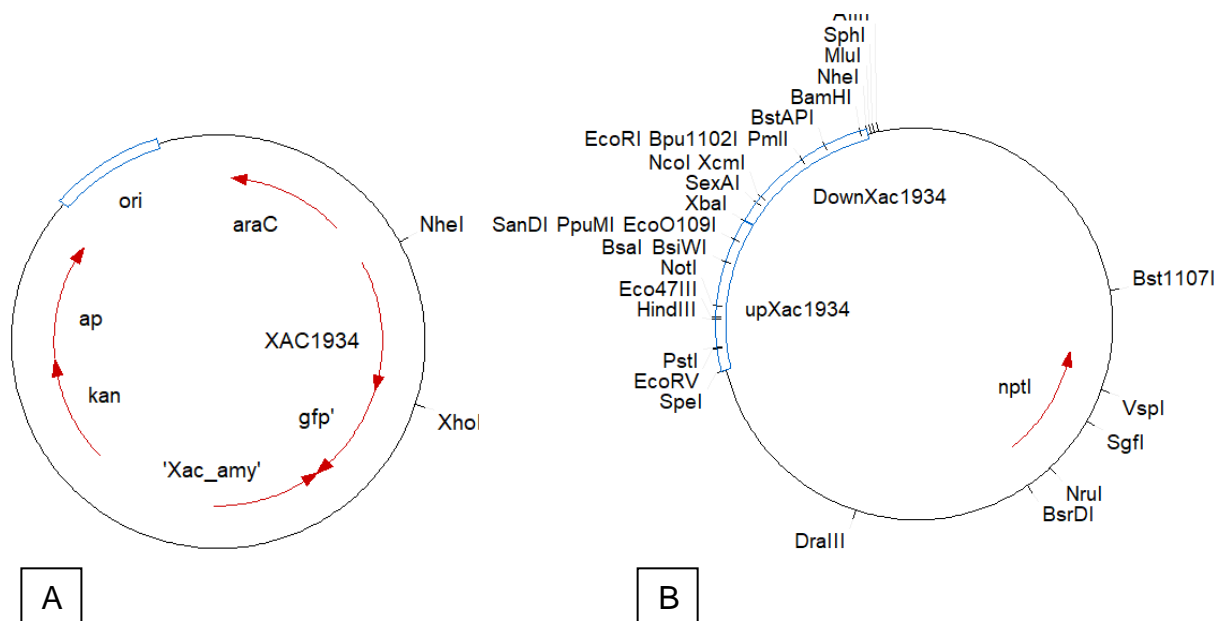
Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE D - Mapas dos vetores feitos com o programa Clone Manager. pGCD21 (A), utilizado para marcação das ORFs com GFP, e pNPTS138 (B), utilizado para a *knockout* das ORFs.



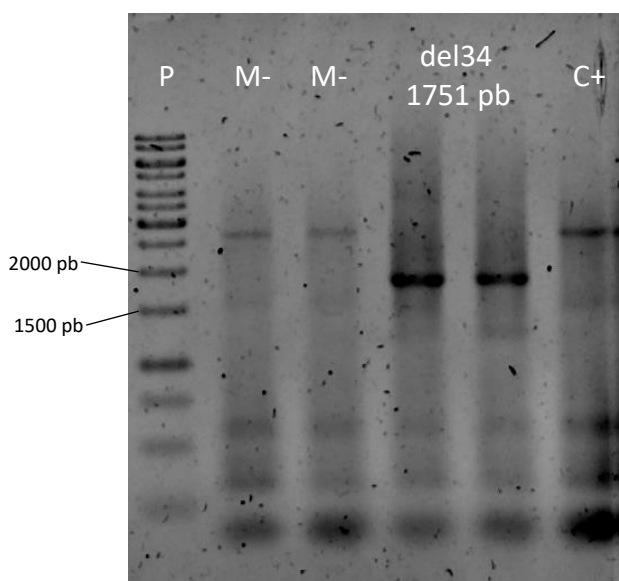
Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE E – Mapas feitos com o programa Clone Manager. Vetor pKUS2, para marcação de *fleN* com GFP C-terminal (A) e pKUS4, para *knockout* de *fleN* (B).



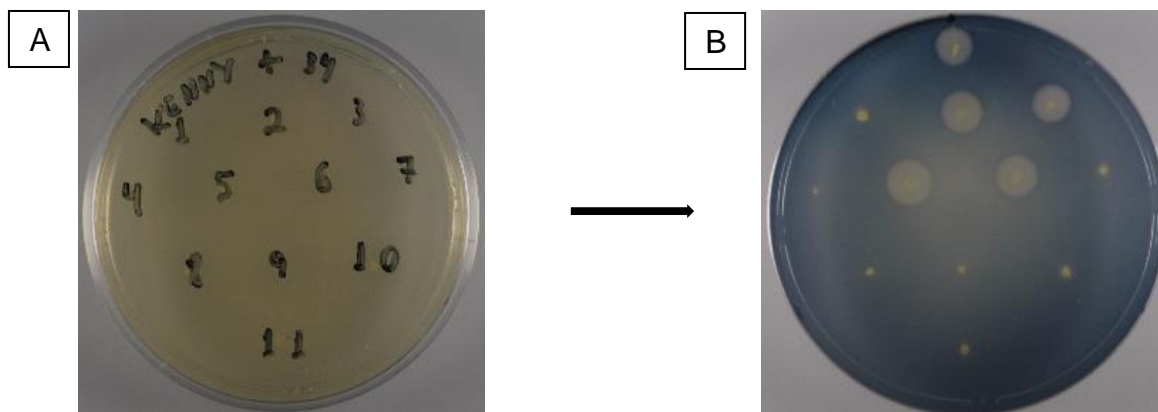
Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE F – Gel de agarose 0,7% com os PCRs de colônia da deleção de *fleN* (del34), mutantes que não apresentaram a deleção (M-), controle com DNAg de *X. citri* (C+), padrão de tamanho molecular (P).



Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE G – Teste do amido com os mutantes XAC1934::pKUS2 e *amy*::pKUS2 inoculados em uma placa de meio NYG sólido contendo 0,2% de amido (A) que foi exposta ao vapor de iodo (B). *Xanthomonas citri* subsp. *citri* WT (+) apresentando degradação de amido assim como mutantes 2, 3, 5 e 6 que tiveram a integração de pKUS2 no *locus* da ORF e mutantes 1, 4, 7, 8, 9, 10 e 11 tiveram a integração plasmidial em *amy*.



Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE H - Identificação das 11 proteínas parálogas a XAC3905 (ParA), segundo o Kegg.

KEGG ID : [xac:XAC3905](#) (265 a.a.)
Definition: chromosome partitioning protein; [K03496](#) chromosome partitioning protein
Update status: [T00084](#) (aay,aec,ahi,aln,bafe,balm,bang,bcat,bed,ben,bfb,bhi,bmab,bmul,boc,bpsc,bthl,bve,calh,cama,ccj,ccof,cfo,c
Show : Best-best Best Paralogs Gene clusters
Sort by : SW-score SW-score by species KEGG-species
Search against: All organisms Selected organism group [Eukaryotes](#) ▾
Threshold:
 ▾ ▾

Search Result : 11 hits

Entry	KO	len	SW-score	bits	identity	overlap
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC1907 chromosome partioning protein	K03496	260	410	99	0.344	241
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XACb0054 partition protein A	K03496	255	266	66	0.269	234
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC2205 chromosome partitioning-like protein	K12055	281	246	62	0.353	170
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XACa0041 partition protein A	K03496	204	220	56	0.282	245
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC1225 septum site-determining protein	K03609	269	205	53	0.264	246
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC2741 hypothetical protein	K03593	283	168	44	0.257	269
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XACa0018 partition protein A	K03496	208	166	44	0.307	238
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XACb0019 partition protein A	K03496	208	166	44	0.307	238
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC1934 flagellar biosynthesis switch protein	K04562	319	156	41	0.266	169
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC0192 partition protein	K03496	210	138	37	0.341	82
<input type="checkbox"/> xac:XAC3802 hypothetical protein		378	114	32	0.328	122

Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE I - Reciprocidade reversa de parálogos a partir de XAC1934.

KEGG ID : [xac:XAC1934](#) (319 a.a.)
Definition: flagellar biosynthesis switch protein; [K04562](#) flagellar biosynthesis protein FlhG
Update status: [T00084](#) (aay,aec,ahi,aln,bafe,balm,bang,bcat,bed,ben,bfb,bhi,bmab,bmul,boc,bpsc,bthl,bve,calh,cama,ccj,ccof,cfo,cku)
Show : Best-best Best Paralogs Gene clusters
Sort by : SW-score SW-score by species KEGG-species
Search against: All organisms Selected organism group Eukaryotes
Threshold: 100

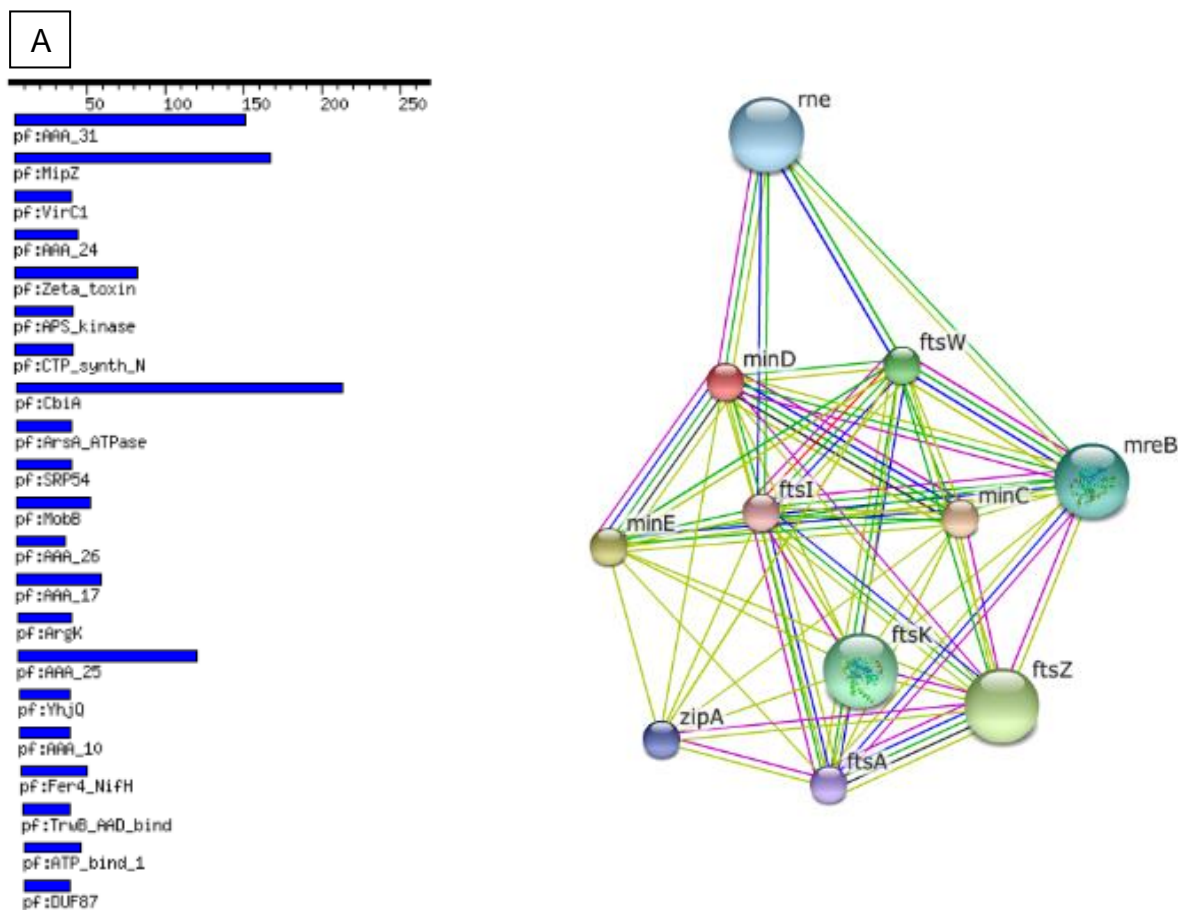
All Select operation

Search Result : 7 hits

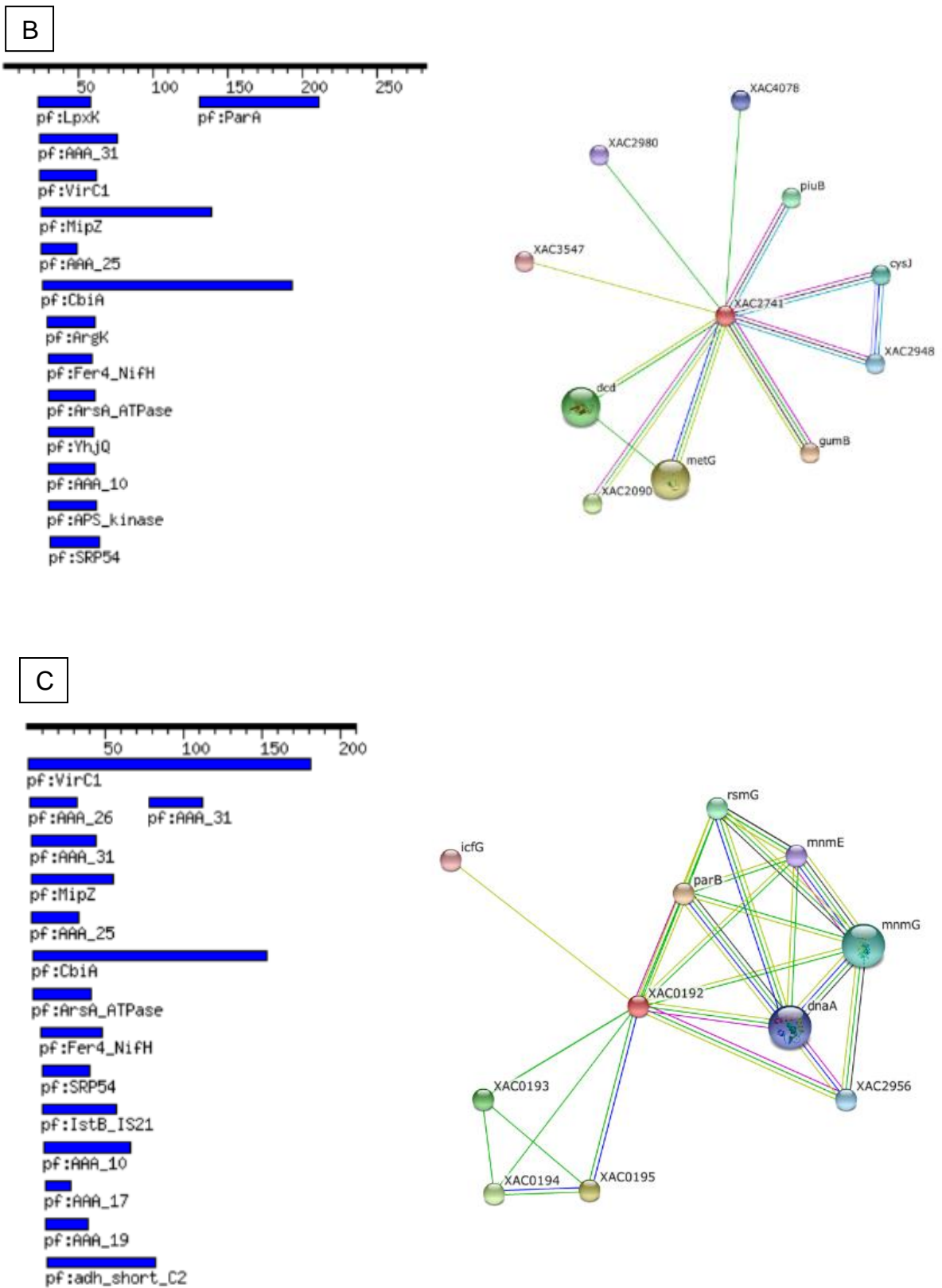
Entry	KO	len	SW-score	bits	identity	overlap
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC1225 septum site-determining protein	K03609	269	299	74	0.318	255
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC2741 hypothetical protein	K03593	283	248	62	0.293	270
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC3905 chromosome partitioning protein	K03496	265	156	41	0.266	169
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XACa0041 partition protein A	K03496	204	137	37	0.418	79
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XAC0192 partition protein	K03496	210	129	35	0.538	39
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XACa0018 partition protein A	K03496	208	106	30	0.571	35
<input checked="" type="checkbox"/> xac:XACb0019 partition protein A	K03496	208	106	30	0.571	35

Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE J - Composição de domínios para outras proteínas ortólogas à XAC3905 e XAC1934. XAC1225 (A), XAC2741 (B) e XAC0192 (C). As cores das linhas nas redes de interação representam: verde – vizinhança genômica, vermelho – fusão gênica, azul – cocorrência gênica, magenta – descrição textual, preto – coexpressão gênica ou proteica e azul claro – homologia.

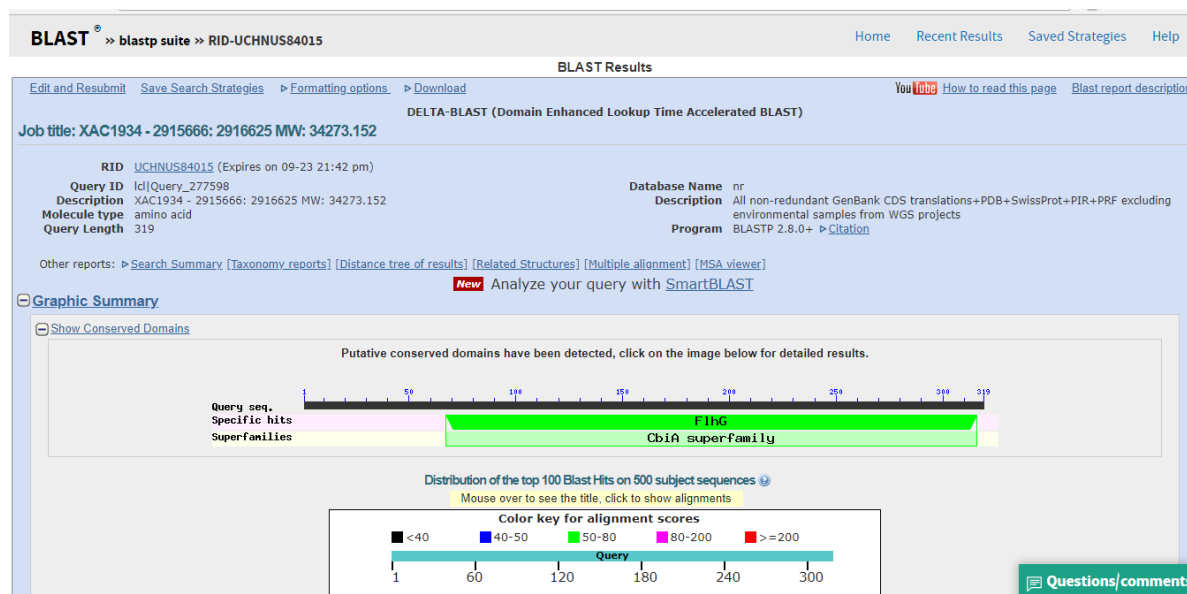


Continuação do apêndice J



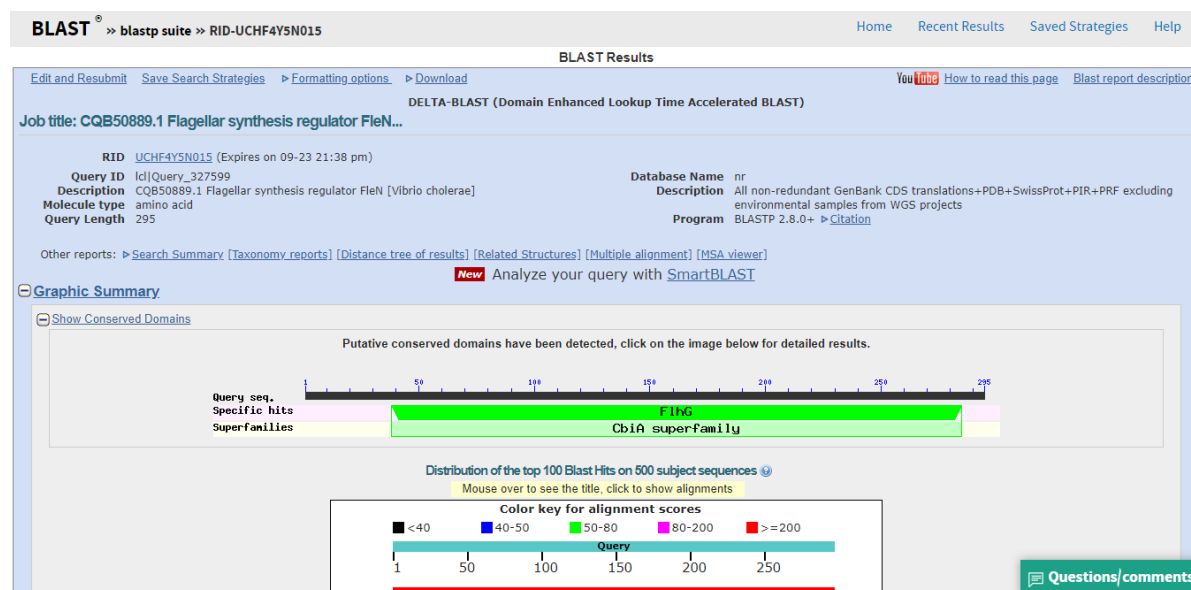
Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE K - Análise da sequência de aminoácidos de XAC1934 utilizando DELTA-BLAST.



Fonte: dado da pesquisa.

APÊNDICE L - Análise da sequência de FleN de *V. cholerae* utilizando DELTA-BLAST.



Fonte: dado da pesquisa.