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

Caracterização de *mreB* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* codificando
uma actina bacteriana

CAMILA MALVESSI PEREIRA

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

Março - 2019

CAMILA MALVESSI PEREIRA

Caracterização de *mreB* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* codificando uma actina bacteriana

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

Coorientadora: Dra. Paula Maria Moreira Martins

Rio Claro

2019

P436c	<p>Pereira, Camila Malvessi</p> <p>Caracterização de mreB de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> codificando uma actina bacteriana / Camila Malvessi Pereira. -- Rio Claro, 2019</p> <p>53 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientador: Henrique Ferreira</p> <p>Coorientadora: Paula Maria Moreira Martins</p> <p>1. Micro-organismos fitopatogênicos. 2. Cancro (Fitopatologia). 3. Genética microbiana. I. Título.</p>
-------	---

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.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Caracterização de *mreB* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* codificando uma actina bacteriana

AUTORA: CAMILA MALVESSI PEREIRA

ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

COORIENTADORA: PAULA MARIA MOREIRA MARTINS

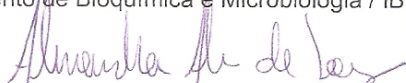
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



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

Rio Claro, 26 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. Henrique Ferreira** por ter tornado este trabalho possível através de sua excelente orientação, conselhos, confiança, amizade e paciência.

À **Dra. Paula Maria Moreira Martins** pela atenciosa coorientação, pelos conselhos e pela amizade ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao processo nº 2017/08856-2 da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento, que possibilitou a obtenção todos os materiais e condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, e em especial aos colegas do Laboratório de Genética de Bactérias, pelo apoio, conselhos e momentos de descontração.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, por garantirem a organização, segurança e bom funcionamento de toda a estrutura do departamento.

À minha família pelo apoio e pela presença em todos os momentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos pelo apoio, ajuda e companheirismo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri*) é o agente etiológico do cancro cítrico, uma doença que ataca todas as variedades comerciais de citros, causando prejuízos econômicos em vários países produtores. Em áreas endêmicas, o cancro cítrico é controlado principalmente por aplicação de bactericidas cúpricos. Compostos alternativos para controlar a doença são desejáveis, pois os bactericidas cúpricos causam impactos ambientais e podem induzir resistência em *X. citri*. Um passo importante para a descoberta e avaliação de novos compostos para controle de *X. citri* é a caracterização de genes/proteínas que são alvos em potencial. O gene *mreB* codifica para uma proteína que é uma actina bacteriana com papel-chave na determinação da morfologia celular. Esses genes foram caracterizados em algumas bactérias, nas quais foi demonstrado que são essenciais. Não existem relatos da caracterização de *mreB* em *X. citri*. A proteína MreB e a actina tem baixa similaridade de sequência, apesar de serem homólogos funcionais. Essas características fazem de MreB um alvo interessante para novos compostos antibacterianos. Os objetivos deste trabalho foram descrever a função e determinar a localização subcelular de MreB em *X. citri*. Para estudar a função de MreB, duas estratégias foram usadas para deletar o gene *mreB* em *X. citri*. Entretanto, não foi possível obter mutantes deletados para *mreB* nem na ausência, nem na presença de complementação. Esse resultado evidenciou que *mreB* é essencial para *X. citri* e mostrou que o método de complementação utilizado não foi adequado para manter a viabilidade de *X. citri*. Para investigar a localização subcelular de MreB em *X. citri*, uma fusão em sanduíche de MreB com GFP foi desenvolvida, e células expressando a fusão foram visualizadas por microscopia de fluorescência e de contraste de fase. As imagens de microscopia de fluorescência e de contraste de fase obtidas de *X. citri* expressando a fusão em sanduíche mostraram células com morfologia de bastonete com manchas de fluorescência predominantemente na periferia da célula. Essas imagens evidenciaram que a fusão em sanduíche foi expressa com sucesso em *X. citri* sem efeitos negativos detectáveis para as células. Essas imagens também revelaram pela primeira vez que a distribuição subcelular de MreB em *X. citri* é muito similar àquela vista na literatura em outras bactérias. Os resultados deste trabalho, além de terem expandido o conhecimento da biologia de *X. citri*, poderão ser utilizados em futuras avaliações de compostos químicos para controle do cancro cítrico.

Palavras-chaves: Cancro cítrico. MreB. Morfologia bacteriana.

ABSTRACT

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri*) is the etiological agent of Citrus canker, a widespread plant disease that attacks all varieties of commercial citrus plants, causing economic loss worldwide. In endemic areas, citrus canker is controlled mainly by the application of cupric bactericides. Alternative compounds to control this pathogen are desirable, since copper based bactericides have negative environmental impact and induce resistance in *X. citri*. An important step for the discovery and evaluation of new compounds to control *X. citri* is the characterization of genes/proteins that are potential targets. The *mreB* gene codes for a protein that is a bacterial actin homologue with a key role in rod shape morphogenesis. This gene was characterized in some bacteria, in which it was shown to be essential. There are no reports of characterization of *mreB* in *X. citri*. MreB and actin have a weak sequence similarity, despite being functional homologues. These characteristics make MreB an interesting target for new antibacterial chemical compounds. The objectives of this work were to study the function and subcellular localization of MreB in *X. citri*. To study the function of MreB in *X. citri*, two strategies were used to delete the *mreB* gene. However, neither strategy produced deleted mutants. This result confirmed that *mreB* is essential to *X. citri* and showed that the complementation method used was not adequate to ensure the viability of *X. citri*. To investigate MreB subcellular localization, a sandwich fusion of MreB with GFP was developed, and cells expressing the fusion were imaged with fluorescence and phase contrast microscopy. The fluorescence and phase contrast microscopy images obtained of *X. citri* expressing the sandwich fusion showed rod shaped cells with spots of fluorescence predominantly at the periphery of the cells. These images indicated that the sandwich fusion was successfully expressed in *X. citri* with no detectable negative effects for the cells. These images also revealed for the first time that the subcellular distribution of MreB in *X. citri* is very similar to that seen in other bacteria. The results of this work expanded the knowledge of the biology of *X. citri* and will also be useful to future evaluations of chemical compounds to control citrus canker.

Key words: Citrus canker. MreB. Bacterial morphology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. A citricultura e o cancro cítrico.....	8
1.2. <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	11
1.3. A proteína MreB.....	13
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	16
2.1. Hipótese.....	16
2.2. Objetivos gerais.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Linhagens bacterianas e cultivo.....	17
3.2. Curvas de crescimento populacional bacteriano.....	17
3.3. Procedimentos de biologia molecular.....	17
3.4. Primers.....	19
3.5. Microscopia.....	20
3.6. Marcação da proteína MreB com GFP.....	20
3.6.1. <i>Determinação aproximada da estrutura secundária de MreB de X. citri.</i>	20
3.6.2. <i>Construção do vetor de fusão em sanduíche de MreB com GFP:</i> <i>estratégia 1.....</i>	20
3.6.3. <i>Construção do vetor de fusão em sanduíche de MreB com GFP:</i> <i>estratégia 2.....</i>	21
3.7. Deleção do gene <i>mreB</i>	22
3.7.1. <i>Amplificação dos insertos.....</i>	22
3.7.2. <i>Construção do vetor de complementação pCMP2.....</i>	23
3.7.3. <i>Construção do vetor de deleção pCMP3.....</i>	26
3.7.4. <i>Deleção do gene mreB em X. citri selvagem.....</i>	27
3.7.5. <i>Deleção do gene mreB em X. citri complementadas.....</i>	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. Marcação de MreB com GFP.....	29
4.1.1. <i>Estrutura secundária aproximada de MreB de X. citri.....</i>	29
4.1.2. <i>Curvas de crescimento populacional de mutantes X. citri amy::pCMP4</i>	32
4.1.3. <i>Microscopia de mutantes X. citri amy::pCMP4.....</i>	34
4.2. Deleção de <i>mreB</i>	37
4.2.1. <i>Estratégia geral.....</i>	37

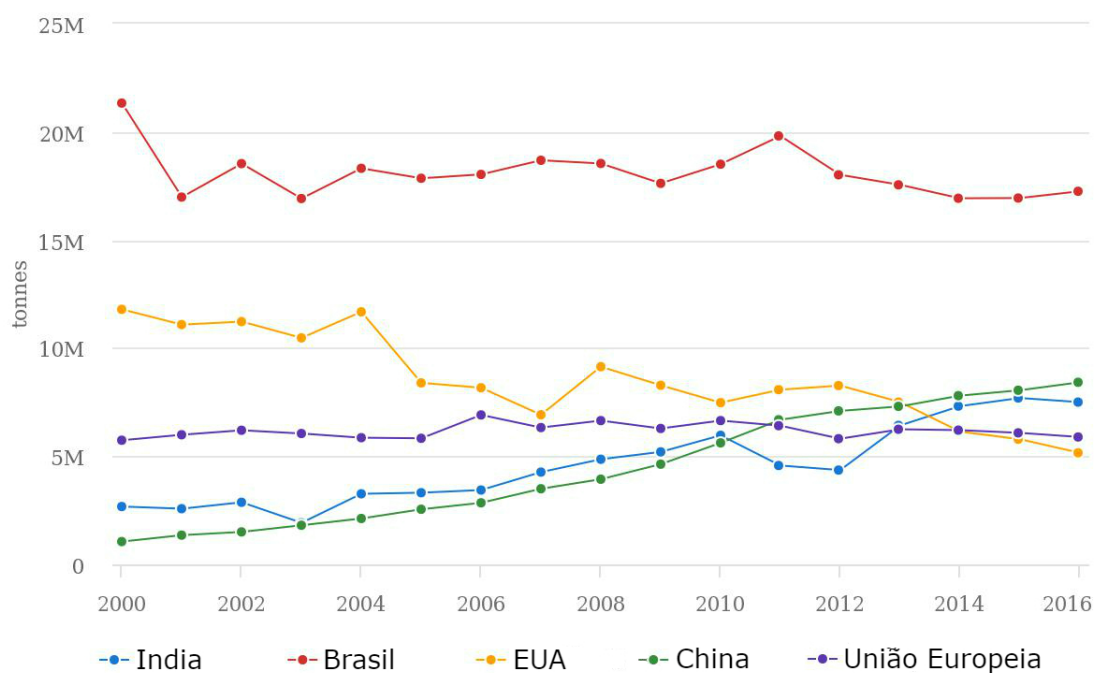
4.2.2. Busca por <i>X. citri</i> selvagem com deleção de <i>mreB</i>.....	38
4.2.3. Integração do vetor de complementação em <i>X. citri</i>.....	39
4.2.4. Busca por <i>X. citri</i> complementadas com deleção de <i>mreB</i>.....	40
5. CONCLUSÕES.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE A – PRIMERS.....	52
APÊNDICE B – LINHAGENS.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. A citricultura e o cancro cítrico

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja (Figura 1), sendo a maior parte da produção destinada à fabricação de suco para exportação (USDA; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, 2018). A região Sudeste é responsável por mais de 70% da produção de laranja do país, o que se deve à enorme produtividade da citricultura no estado de São Paulo (IBGE, 2016). Apesar de ser um dos setores de agronegócio mais competitivos brasileiros, a citricultura está constantemente ameaçada por doenças como o greening (HLB) e o cancro cítrico (NEVES et al., 2010).

Figura 1 – Produção de laranja em toneladas no período de 2000 a 2016 pelos países que lideram a produção mundial.



Fonte: FAOSTAT, 14 de Agosto de 2018.

O cancro cítrico é uma das doenças bacterianas mais preocupantes para a citricultura no Brasil (BEHLAU; BELASQUE, 2014). A forma de cancro mais disseminada e severa, o cancro cítrico tipo A ou cancro cítrico Asiático, é causada pelas bactérias *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) (SCHAAD et al., 2006). Na América do Sul, existem ainda os tipos B e C de cancro cítrico, causados por

linhagens de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. Essas variações da doença são menos severas e afetam um espectro menor de hospedeiros (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002).

A disseminação do cancro cítrico ocorre principalmente por chuva combinada ao vento, pois as gotículas de água transportam bactérias provenientes das lesões para plantas próximas. A atividade humana promove a dispersão da doença a longas distâncias, por meio de transporte de material vegetal e de equipamentos contaminados (GRAHAM et al., 2004).

A bactéria penetra na planta por aberturas naturais (os estômatos) ou ferimentos, produzindo os sintomas do cancro cítrico (GRAHAM et al., 2004). A doença manifesta-se na forma de lesões corticosas e salientes em folhas, ramos e frutos (Figura 2). Essas lesões resultam da divisão (hiperplasia) e expansão (hipertrofia) intensa das células vegetais, o que eventualmente leva ao rompimento da epiderme. Os ferimentos nas folhas causados pela larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), facilitam a infecção e contribuem para a disseminação da doença (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Figura 2 – Lesões características do cancro cítrico em folhas, frutos e ramos.



Fonte: adaptado de Gottwald, Graham e Schubert (2002).

O cancro cítrico A em estágio avançado pode causar queda prematura de frutos e folhas (BEHLAU, 2010). Além disso, as frutas contaminadas têm valor reduzido e enfrentam rígidas restrições para a comercialização com regiões isentas do patógeno, em território nacional e internacional (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). Em áreas onde o cancro cítrico não é endêmico, a estratégia de controle mais utilizada é a exclusão e erradicação de plantas (BELASQUE JUNIOR et al., 2010). Em áreas endêmicas, o controle é feito por aplicação de bactericidas

cúpricos, instalação de quebra-ventos (BEHLAU et al., 2008), e plantio preferencial de cultivares menos suscetíveis (DE CARVALHO et al., 2015).

A partir do primeiro registro do cancro cítrico no Brasil, em 1957, no município de Presidente Prudente, medidas de erradicação e exclusão foram adotadas no país com intuito de eliminar a doença (BELASQUE JR.; FERNANDES; MASSARI, 2009). Em 23 de julho de 1997, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu em sua Portaria 291 que nos pomares onde fosse diagnosticada a doença deveria ser realizada a eliminação ou poda drástica das plantas contaminadas, enquanto que nas plantas em um raio mínimo de 30 metros deveria ser aplicada poda drástica, desfolha química ou pulverização com calda cúprica (BRASIL, 1997). A partir de 1997 ocorreu aumento na incidência da doença no estado de São Paulo, devido à introdução da larva minadora dos citros *Phyllocnistis citrella*. Isso levou à Resolução CEE-CANECC/SP-1 de 20 de março 2000 que exigia a eliminação de todas as árvores de talhões comerciais com incidência de plantas sintomáticas superior a 0,5%; nos talhões em que o percentual de plantas contaminadas fosse igual ou inferior a 0,5%, deveriam ser eliminadas as plantas infectadas e todas as outras em um raio de 30 metros (GOTTWALD et al., 2007; BELASQUE JUNIOR et al., 2010).

A campanha de erradicação do cancro cítrico iniciada em 2000 não teve boa aceitação por parte dos citricultores, o que levou ao abrandamento da legislação. A Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA/SP) determinou em 2009 que o controle do cancro cítrico fosse feito novamente de acordo com a Portaria 291 de 1997 (BELASQUE JUNIOR et al., 2010). Isso levou a um aumento no número de talhões contaminados de 0,14% em 2009 para 1,39% em 2012 (BEHLAU; BELASQUE, 2014). Ainda em concordância com a Portaria 291 de 1997, em 2013 a resolução 147 da SAA/SP determinou que plantas infectadas pelo cancro cítrico deveriam ser eliminadas e as plantas adjacentes num raio mínimo de 30 metros deveriam ser pulverizadas com calda cúprica (SÃO PAULO, 2013).

Em setembro de 2016 foi publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a instrução normativa (IN) n° 37, que estabelece em território nacional quatro cenários fitossanitários relativos ao cancro cítrico: área com praga ausente, área livre de praga (ALP), área sob erradicação ou supressão, e área sob sistema de mitigação de risco (SMR) (BRASIL, 2016). A Resolução SAA-10, de 20 de fevereiro de 2017, oficializou o estado de São Paulo como área sob Sistema de

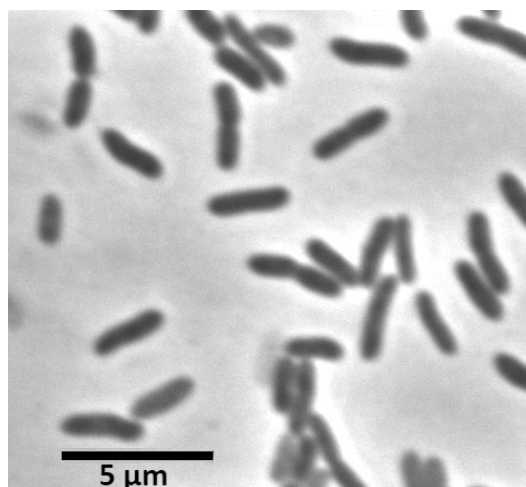
Mitigação de Risco (SMR) (SÃO PAULO, 2017), ficando o estado sujeito à observação das medidas propostas para este tipo de cenário. As medidas de manejo que devem ser adotadas em propriedades sob SMR são: (1) Uso preferencial de cultivares menos suscetíveis ao cancro cítrico, (2) remoção de frutos contaminados, que devem ser destruídos ou enviados para a indústria de suco, (3) tratamentos fitossanitários preventivos, (4) manejo integrado do minador dos citros, (5) descontaminação de ferramentas e máquinas e (6) uso de quebra-ventos (BRASIL, 2018).

1.2. *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri*) (SCHAAD et al., 2006) é causadora do cancro cítrico tipo A, que afeta todas variedades comerciais de citros (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). *X. citri* são Proteobacterias Gram-negativas, aeróbicas obrigatórias, têm morfologia de bastonetes (Figura 3), e apresentam um flagelo polar (DAS, 2003). São características do gênero *Xanthomonas* a produção do pigmento xantomonadina (JENKINS; STARR, 1982), que torna as colônias amarelas, e a produção do exopolissacarídeo goma xantana, que está diretamente envolvido na produção de biofilme (LI; WANG, 2011).

Figura 3 – Células de *X. citri* selvagem.

Microscopia de contraste de fase de células em fase de crescimento exponencial, aumento de 100X.



Fonte: foto adquirida e processada com o programa CellSens Dimension 11 (Olympus).

O biofilme é essencial para a sobrevivência de *X. citri* durante fase epifítica da doença e para a colonização dos tecidos da planta (RIGANO et al., 2007). Após penetrar no hospedeiro através de ferimentos ou estômatos, *X. citri* utiliza o sistema de secreção tipo III (SST3) para secretar proteínas de virulência (ou proteínas efetoras) no citoplasma das células vegetais (GOTTIG et al., 2010). A principal proteína efetora secretada pelo SST3 de *X. citri* é PthA. O gene *pthA* de *X. citri* pertence à família gênica *avrBs3*, e é requerido para a expressão dos sintomas típicos do cancro cítrico em plantas suscetíveis (SWARUP et al., 1992). Quando *pthA* é inserido em outras espécies de *Xanthomonas*, confere a elas capacidade de causar o cancro cítrico (SWARUP et al., 1991). A proteína PthA atua por meio da alteração da transcrição de diversos genes da célula hospedeira (CERNADAS; CAMILLO; BENEDETTI, 2008).

Xanthomonas citri subsp. *citri* teve seu genoma sequenciado em 2002 e foram realizadas comparações com os genomas de outras espécies de *Xanthomonas*, o que contribuiu para a identificação de genes relacionados à patogenicidade e ao espectro de hospedeiros de cada linhagem (DA SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2010). *X. 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 ~64%. 4.313 ORFs foram anotadas e dentre estas, 2.710 apresentaram homologia com genes codificando para fatores conhecidos. As 1.603 ORFs restantes foram classificadas como hipotéticas, sendo que destas, 1.272 foram consideradas conservadas, por apresentarem homologia com ORFs de mesma categoria em outros organismos (DA SILVA et al., 2002)

Diversos grupos de pesquisa têm se valido das informações do genoma para estudar genes de *X. citri* possivelmente relacionados aos mecanismos de patogenicidade e interação bactéria-planta, sendo este o principal foco das pesquisas em genética de *X. citri* (LAIA et al., 2009; DUNGER et al., 2012; YAN; WANG, 2012; LI; WANG, 2014) Entretanto, o conhecimento do genoma de *X. citri* permite também a caracterização de genes envolvidos em outros aspectos essenciais e pouco explorados da biologia dessa bactéria, como a divisão celular (MARTINS et al., 2010; LORENZONI et al., 2017; SAVIETTO et al., 2018), e a segregação cromossômica (UCCI et al., 2014; LACERDA et al., 2017). A caracterização de genes ainda pouco estudados em *X. citri* é importante para a

avaliação do potencial de novos compostos para controle do cancro cítrico, como tem sido feito no nosso grupo de pesquisa (KRÓL et al., 2015; KOPACZ et al., 2018).

1.3. A proteína MreB

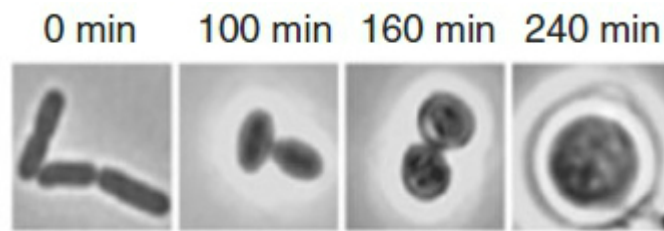
A parede celular bacteriana, além de ser essencial para proteção da célula contra os efeitos da alta pressão osmótica interna, é a estrutura mais importante para a determinação da morfologia celular (HOLTJE, 1998). A parede celular é composta pelo polímero peptidoglicano e a maior parte das proteínas envolvidas em sua síntese já foram identificadas e caracterizadas. Contudo, ainda não é conhecido em sua totalidade o mecanismo pelo qual a síntese de peptidoglicano é regulada de modo a produzir uma morfologia celular definida e constante. Evidências apontam que a proteína MreB tem papel-chave neste processo (WHITE; KITICH; GOBER, 2010; SHI et al., 2018).

A actina eucariótica e a proteína bacteriana MreB são consideradas homólogas, apesar da baixa similaridade entre suas sequências de aminoácidos (ENT; AMOS; LÖWE, 2001). Isso se deve à grande similaridade estrutural, funcional e nas propriedades de polimerização dessas proteínas (ENT; AMOS; LÖWE, 2001; AMOS; ENT; LÖWE, 2004).

O gene *mreB* foi primeiro identificado a partir de linhagens mutantes de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* com morfologias alteradas (WACHI et al., 1987; LEVIN et al., 1992). Desde então, experimentos com diferentes bactérias, forneceram evidências de que MreB é o principal fator determinante da morfologia celular bacteriana (ENT; AMOS; LÖWE, 2001; JONES; CARBALLIDO-LÓPEZ; ERRINGTON, 2001; FIGGE; DIVAKARUNI; GOBER, 2004). Quando é feita depleção de MreB as células bacterianas perdem a sua morfologia normal e eventualmente sofrem lise, indicando a essencialidade dessa proteína (Figura 4) (JONES; CARBALLIDO-LÓPEZ; ERRINGTON, 2001; KRUSE; BORK-JENSEN; GERDES, 2005). Além do papel na determinação da morfologia celular bacteriana, há evidências de que MreB atue na segregação cromossômica (SRIVASTAVA et al., 2007) e na determinação da polaridade celular (NILSEN et al., 2005).

Figura 4 – Experimento de depleção de MreB feito com *E. coli*.

Imagens de microscopia de contraste de fase de células de *E. coli* após passarem diferentes períodos de tempo na ausência da proteína MreB.



Fonte: adaptado de Kruse et al. (2005).

Experimentos em diversas bactérias evidenciaram que MreB interage e se associa com muitas proteínas envolvidas na síntese de peptidoglicano. Essas proteínas são: as proteínas de ligação à penicilina (responsáveis pela incorporação de precursores de peptidoglicano na parede preexistente) (DIVAKARUNI et al., 2007; KAWAI; DANIEL; ERRINGTON, 2009), as proteínas sintetizadoras de precursores de peptidoglicano (MOHAMMADI et al., 2007; RUEFF et al., 2014), proteínas sintetizadoras de ácido teicóico (FORMSTONE et al., 2008; KAWAI et al., 2011) e enzimas autolíticas (CARBALLIDO-LÓPEZ et al., 2006; DOMÍNGUEZ-ESCOBAR et al., 2011). Essas descobertas sugerem que MreB atua no posicionamento da maquinaria enzimática que participa da síntese de peptidoglicano.

As primeiras investigações da localização subcelular da proteína MreB sugeriram que ela forma filamentos contínuos dispostos como uma hélice ao redor do eixo longitudinal da célula, logo abaixo da membrana citoplasmática (Figura 5-A) (JONES; CARBALLIDO-LÓPEZ; ERRINGTON, 2001; SHIH; LE; ROTHFIELD, 2003). Essa ideia surgiu a partir de imagens de microscopia de células expressando MreB marcada com fluorescência (SHIH; LE; ROTHFIELD, 2003) ou expressando MreB selvagem ligada a anticorpos fluorescentes (FIGGE; DIVAKARUNI; GOBER, 2004; JONES; CARBALLIDO-LÓPEZ; ERRINGTON, 2001; KRUSE; BORK-JENSEN; GERDES, 2005). Entretanto, a partir de 2011 foram publicados trabalhos que contestaram a teoria de que MreB forma filamentos em hélice (DOMÍNGUEZ-ESCOBAR et al., 2011; GARNER et al., 2011; TEEFFELEN et al. 2011; SWULIUS et al., 2011).

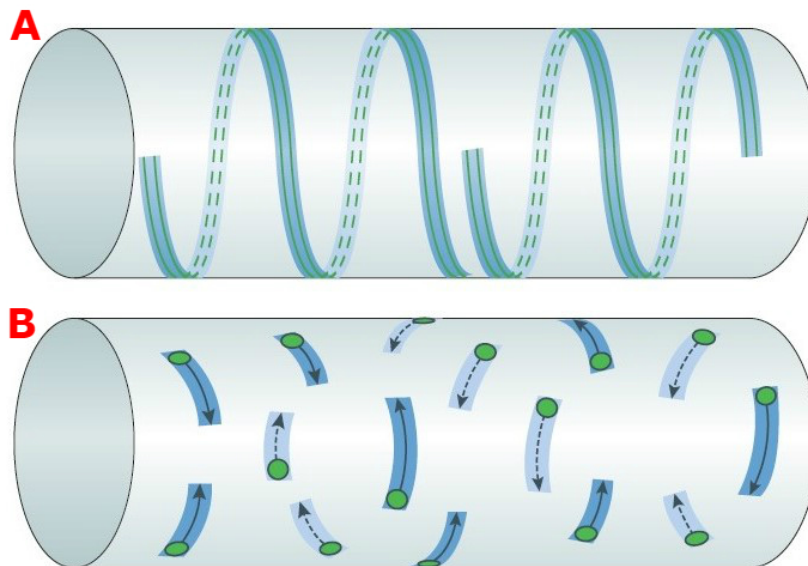
Em 2011, imagens produzidas pela técnica de alta resolução *electron cryotomography* não encontraram filamentos helicais de MreB em nenhuma entre 6

espécies de bactérias analisadas (SWULIUS et al., 2011). Além disso, estudos da dinâmica de MreB na célula forneceram evidências de que MreB forma manchas ou filamentos curtos independentes, que movem-se perpendicularmente ao eixo longitudinal da célula (Figura 5-B) (DOMÍNGUEZ-ESCOBAR et al., 2011; GARNER et al., 2011; TEEFFELEN et al. 2011). Por conseguinte, atualmente a teoria de que MreB está distribuída como manchas ou filamentos curtos ao redor do eixo longitudinal das células bacterianas é mais aceita (Figura 5-B).

Figura 5 – Esquemas dos modelos propostos na literatura para a distribuição espacial de MreB em células bacterianas.

A: Investigações iniciais da localização subcelular de MreB sugeriram que essa proteína forma filamentos alongados e contínuos que enrolam-se como uma hélice ao redor do eixo longitudinal da célula em sua periferia.

B: Trabalhos mais recentes propuseram que MreB forma manchas ou filamentos curtos desconectados que movimentam-se perpendicularmente ao eixo longitudinal da célula em sua periferia.



Fonte: adaptado de Errington (2015).

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1. Hipótese

O gene *mreB* de *X. citri* codifica para uma proteína essencial que está envolvida na determinação da morfologia celular e localiza-se como filamentos curtos logo abaixo da membrana plasmática.

2.2. Objetivos gerais

Descrever a função e determinar a localização subcelular da proteína codificada pelo gene *mreB* em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas e cultivo

Foi utilizada a linhagem 306 de *X. citri* (SCHAAD et al., 2006), que teve o genoma sequenciado por da Silva et al. (2002). Para a clonagem foi utilizada a linhagem de *E. coli* DH10B. A linhagem de *X. citri* foi cultivada a 30 °C em meio NYG (peptona 5 g·L⁻¹, extrato de levedura 3 g·L⁻¹, glicerol 20 g·L⁻¹) com ou sem ágar (15 g·L⁻¹). *E. coli* foi cultivada em meio LB (extrato de levedura 5 g·L⁻¹, triptona 10 g·L⁻¹, cloreto de sódio 10 g·L⁻¹) a 37 °C, acrescido ou não de ágar (15 g·L⁻¹) e contendo antibióticos quando necessário (SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, 1989). Foram utilizados os antibióticos canamicina, ampicilina e gentamicina na concentração de 20 µg·mL⁻¹.

3.2. Curvas de crescimento populacional bacteriano

Para a obtenção de curvas de crescimento populacional bacteriano, as linhagens de *X. citri* (selvagem e mutantes) foram cultivadas *overnight* e no momento de início da curva as culturas foram diluídas para a D.O. _{600 nm} de ~0,1. As culturas foram distribuídas em placas de 24 poços com volume final de 1,5 ml; as leituras de D.O. _{600 nm} foram realizadas por um leitor de microplacas Synergy H1 (BioTek) a cada 30 minutos a 30 °C por 48 horas. As curvas de crescimento foram construídas por regressão não-linear suavizada (LOWESS) com o programa Graphpad Prism v. 6.

3.3. Procedimentos de biologia molecular

Técnicas estabelecidas de biologia molecular seguiram (SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, 1989). Extrações de DNA total de *X. citri* foram executadas com o kit Invisorb Spin Tissue Mini (Invitek, código 10321003). Extrações de DNA plasmidial foram realizadas com o kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, código K0502), e extrações de DNA do gel de agarose 0,7% foram realizadas com o kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, código K0691). As reações de ligação foram realizadas com a enzima T4 DNA ligase

(Thermo Fisher Scientific, código EL0011). A transformação de *X. citri* foi realizada por eletroporação, conforme descrito por Ferreira et al. (1995). As reações de PCR foram realizadas com um termociclador Bio Rad modelo T100 com a utilização das enzimas Pfu DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific, código EP0501) ou Taq DNA Polimerase (GeneDireX). A enzima Pfu DNA Polimerase possui maior fidelidade, e portanto foi utilizada em PCRs nos quais a precisão das sequências amplificadas foi crucial. Nos demais PCRs foi utilizada a Taq DNA Polimerase. Reações de PCR com a enzima Pfu DNA Polimerase e Taq DNA Polimerase foram preparadas conforme descrito na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – PCRs com Pfu DNA Polimerase

Componente	Quantidade por reação
Água MiliQ autoclavada	Suficiente para completar 30 µl
Tampão da enzima (10X)	Diluído para 1X (3,0 µl)
DNA molde	10,0 ng
Primer forward	1,0 µM
Primer reverse	1,0 µM
Mix de dNTPs	100,0 µM
MgCl ₂	1,5 mM MgCl ₂
Enzima PFU DNA polimerase	1,0 U
Volume final	30,0 µl

Tabela 2 – PCRs com Taq DNA Polimerase

Componente	Quantidade por reação
Água MiliQ autoclavada	Suficiente para completar 20 µl
Tampão da enzima (10X)	Diluído para 1X (2,0 µl)
DNA molde	10,0 ng
Primer forward	0,2 µM
Primer reverse	0,2 µM
Mix de dNTPs	100,0 µM
MgCl ₂	1,5 mM MgCl ₂
Enzima Taq DNA polimerase	2,5 U
Volume total	20,0 µl

Para realização das clonagens em *E. coli*, células quimicamente competentes por tratamento com cloreto de cálcio foram transformadas por choque térmico (SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, 1989) e em seguida plaqueadas em meio LB com o antibiótico adequado. Após as transformações, colônias transformantes foram analisadas por extração de DNA total seguida de eletroforese em gel de agarose 0,7%. Após a eletroforese é feita uma comparação

da altura da banda do plasmídeo da colônia com a altura da banda do controle negativo (vetor original no estado circular). Clones positivos foram submetidos à extração de DNA plasmidial com kit para posterior análise com enzimas de restrição.

3.4. Primers

Primers foram desenhados (Apêndice A) com base na sequência genômica de *X. citri* 306 depositada no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), código de acesso NC_003919.1. Foi utilizado o software Artemis v. 17.0.1 (CARVER et al., 2012) para visualização do genoma de *X. citri* e obtenção da sequência de nucleotídeos do gene *mreB* e de aminoácidos da proteína MreB. A análise de parâmetros termodinâmicos e otimização dos primers foi feita com o auxílio do software Gene Runner v. 6.5.50 (FRANK BUQUICCHIO AND MICHAEL SPRUYT, 2018). Foram ainda adicionados sítios de clivagem de enzimas de restrição aos primers (Apêndice A), para permitir as clonagens nos vetores adequados (Quadro 1). Os primers utilizados foram sintetizados pelas empresas IDT e Exxtend.

Quadro 1 – Vetores utilizados, com suas respectivas características e referências.

Vetor	Principais características	Massa	Referência
pGCD21	Derivado de pHF5Ca (Ucci et al., 2014); <i>araC-para-gfpmut1</i> ; <i>amy106-912</i> ; Ap ^R ; Km ^R ; vetor integrativo em <i>X. citri</i>	6680 pb	GenBank KU678206 (Lorenzoni et al., 2017).
pNPTS138	gene <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> ; Km ^R ; vetor suicida em <i>X. citri</i>	5361 pb	Prof. Lucy Shapiro (Stanford University, USA).
pJET 1.2	Vetor replicativo comercial; Ap ^R	2974 pb	Thermo Fisher Scientific
pCMP1	Derivado de pGCD21; <i>araC-para-mreB</i> ; <i>amy106-912</i> ; Ap ^R ; Km ^R ; vetor integrativo em <i>X. citri</i>	6990 pb	Este trabalho.
pCMP2	Derivado de pGCD21; <i>araC-para-mreB</i> ; <i>amy106-912</i> ; Gm ^R ; vetor integrativo em <i>X. citri</i>	6381 pb	Este trabalho.
pCMP3	Derivado de pNPTS138; gene <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> ; sequências <i>upstream</i> e <i>downstream</i> de <i>X. citri</i> ; Km ^R ; vetor suicida em <i>X. citri</i>	6900 pb	Este trabalho.
pCMP4	Derivado de pGCD21; fusão em sanduíche <i>mreB-gfp</i> ; <i>araC-para-f1-gfp-f2</i> ; <i>amy106-912</i> ; Ap ^R ; Km ^R ; vetor integrativo em <i>X. citri</i>	7723 pb	Este trabalho.

*Ap^R, Km^R, Gm^R, resistência à ampicilina, canamicina e gentamicina, respectivamente.

3.5. Microscopia

As linhagens de *X. citri* foram cultivadas em meio NYG (suplementado ou não com arabinose) a partir da D.O._{600nm} 0,1 a 30 °C. Ao atingirem a D.O._{600nm} de 0,4 as células foram imobilizadas em lâminas de agarose 0,9% como descrito por Martins et al. (2010) e visualizadas usando um microscópio Olympus BX-61 equipado com uma câmera Orca-Flash 2.8 (Hamamatsu). Para observação de proteínas marcadas com fluorescência *in situ* foi utilizado um filtro específico. Para documentação e análise de dados foi utilizado o programa CellSens v.11 (Olympus).

3.6. Marcação da proteína MreB com GFP

3.6.1. Determinação aproximada da estrutura secundária de MreB de *X. citri*

Foi seguida a estratégia de fusão em “sanduíche” utilizada por Bendezú et al. (2009). Para isso, foi feita uma determinação aproximada da estrutura secundária de MreB de *X. citri* utilizando as ferramentas disponíveis online: Yaspin (LIN et al., 2005), JPred4 (DROZDETSKIY et al., 2015), CFSSP (KUMAR, 2013), SOPMA (GEOURJON; DELEAGE, 1995) e ConSSert (KIESLICH et al., 2016). Em seguida foi feito um alinhamento da sequência de aminoácidos de MreB de *X. citri* com MreB de *Thermotoga maritima* utilizando o programa ClustalW/BioEdit. Depois foi feita a sobreposição manual da estrutura secundária de MreB de *X. citri* com MreB de *Thermotoga maritima* (ENT; AMOS; LÖWE, 2001) a fim de identificar a região entre as hélices 6 e 7, onde foi planejada a inserção da proteína GFP. Essa fusão foi ligada ao vetor pGCD21 para gerar o plasmídeo pCMP4.

3.6.2. Construção do vetor de fusão em sanduíche de MreB com GFP: estratégia 1

Foram criados primers específicos para a amplificação por PCR das duas partes do gene *mreB* de *X. citri* (Apêndice A): fragmento 1 (aminoácidos 1 ao 226) e fragmento 2 (aminoácidos 227 ao 348). Da mesma forma, foram criados primers específicos para a amplificação do gene *gfp* (Apêndice A). As reações de PCR foram preparadas de acordo com a enzima Pfu DNA Polimerase e passaram pelos ciclos

descritos na Tabela 3. Os dois fragmentos de *mreB* foram amplificados a partir do DNA genômico de *X. citri*. O fragmento 1 foi amplificado com os primers *mreB-f1F* e *mreB-f1R* (Tabela 3, PCR1) e o fragmento 2 foi amplificado com os primers *mreB-f2F* e *mreB-f2R* (Tabela 3, PCR2). O gene *gfp* foi amplificado por PCR com os primers *Gfp-mreBF* e *Gfp-mreBR* (Tabela 3, PCR3) utilizando o plasmídeo pGCD21 como molde. As reações de PCR realizadas tiveram seus produtos verificados por eletroforese em gel de agarose 0,7%. Os produtos corretos foram purificados a partir do gel e em seguida individualmente ligados ao vetor pJET 1.2 (Thermo Fisher Scientific, código K1231).

Tabela 3 – Ciclos de PCR

Repetições	Etapa	PCR1 (<i>f1</i>) e PC3 (<i>gfp</i>)	PCR2 (<i>f2</i>)
1	Desnaturação inicial	95 °C – 3 min.	95 °C – 3 min.
35	Desnaturação	95 °C – 30 seg.	95 °C – 30 seg.
	Anelamento	65 °C – 30 seg.	-----
	Extensão	72 °C – 2 min.	70 °C – 1 min

Para construir o vetor pCMP4 contendo a fusão em sanduíche *mreB-gfp* os três insertos foram retirados dos seus respectivos vetores pJET por clivagens com endonucleases específicas. O vetor pGCD21 foi clivado e ligado simultaneamente aos 3 insertos. Células competentes de *E. coli* foram transformadas e selecionadas em meio com ampicilina.

3.6.3. Construção do vetor de fusão em sanduíche de *MreB* com GFP: estratégia 2

Foi solicitada a síntese química desta construção plasmidial à empresa FastBio. Para isso, foi feita uma simulação de ligação entre os três insertos através do programa Clone Manager v. 6.00 e a sequência gerada foi enviada à empresa. O vetor pGCD21 foi purificado e uma alíquota foi enviada à FastBio para ser utilizada na síntese.

O plasmídeo pCMP4 recebido foi utilizado para transformação por eletroporação de células de *X. citri*, que foram plaqueadas em meio com canamicina. As colônias obtidas foram inoculadas em placas NYG 0,2% de amido junto com *X. citri* selvagem (controle positivo) para realização do teste de degradação de amido,

que objetiva identificar o local de integração do vetor no cromossomo bacteriano. A degradação de amido foi detectada pela exposição da placa a vapor de iodo (MARTINS et al., 2010). Em seguida, algumas colônias foram estocadas em freezer -80 °C e posteriormente observadas por microscopia de fluorescência e de contraste de fase.

3.7. Deleção do gene *mreB*

3.7.1. Amplificação dos insertos

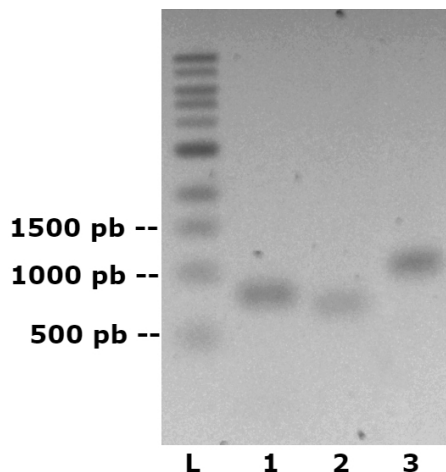
As sequências necessárias para as construções plasmidiais planejadas foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico de *X. citri* por PCR com primers específicos (Apêndice A). As reações de PCR passaram pelos ciclos descritos na Tabela 4. O gene *mreB* foi amplificado por PCR a partir de DNA genômico de *X. citri* com os primers *mreBF-comp* e *mreBR-comp* (Tabela 4, PCR4). As duas sequências de DNA com aproximadamente 1000 pb adjacentes às extremidades 5' e 3' do gene *mreB*, necessárias para a construção do vetor de deleção, foram amplificadas por PCR tendo como molde o DNA genômico de *X. citri*. Para amplificar o fragmento *upstream* foram utilizados os primers *mreBupF* e *mreBupR* (Tabela 4, PCR5); para o *downstream* foram utilizados os primers *mreBdownF* e *mreBdownR* (Tabela 4, PCR6). Após a verificação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 0,7% (Figura 6), os insertos foram purificados para serem utilizados nas etapas de clonagem.

Tabela 4 – Ciclos de PCR

Repetições	Etapa	PCR4 (<i>mreB</i>), PCR5 (<i>upstream</i>), PCR6 (<i>downstream</i>)
1	Desnaturação inicial	95 °C – 2:30 min.
35	Desnaturação	95 °C – 30 seg.
	Anelamento	65 °C – 30 seg.
	Extensão	70 °C – 2:30 min.

Figura 6 – Insetos *mreB*, *upstream* e *downstream* amplificados por PCR.

O gene *mreB* e as duas sequências de DNA adjacentes às extremidades 5' e 3' do gene *mreB* foram amplificados por PCR a partir de DNA genômico de *X. citri* e os produtos verificados por eletroforese em gel de agarose 0,7%. **1:** banda do fragmento *upstream* ao gene *mreB* com 816 pb; **2:** banda do fragmento *downstream* ao gene *mreB* com 750 pb; **3:** banda do gene *mreB* com 1100 pb; **L:** padrão de massa molecular.



Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa Pixlr Editor.

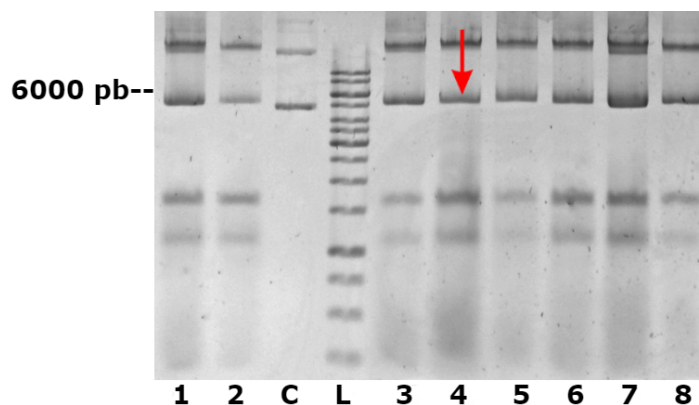
3.7.2. Construção do vetor de complementação pCMP2

A estratégia de depleção proteica adotada consistiu em uma etapa de complementação, seguida da etapa de deleção do gene *mreB* nativo. Para a construção do vetor de complementação, o gene *mreB* (aproximadamente 1100 pb) purificado foi ligado ao vetor pJET 1.2 (Thermo Fisher Scientific, código K1231) em *E. coli*. O gene *mreB* foi retirado do pJET 1.2 de um clone sequenciado por reações de clivagem com as enzimas *XhoI* e *XbaI*, sítios presentes nas extremidades do inserto. As reações de clivagem foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7% para verificação do tamanho dos produtos e purificação do inserto *mreB*.

O gene *mreB* purificado e clivado foi então ligado ao vetor pGCD21 (GenBank KU678206), previamente clivado com as mesmas enzimas, produzindo o vetor pCMP1. A reação de ligação foi usada na transformação de *E. coli*, e em seguida as células foram selecionadas em meio contendo ampicilina, a marca do vetor pCMP1. As colônias resultantes tiveram seu DNA total extraído e analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7%, para verificação do tamanho do plasmídeo presente nas células transformantes (Figura 8). O tamanho do vetor pCMP1 deveria ser maior do que o do pGCD21 devido à adição de *mreB*, o que foi confirmado após eletroforese (Figura 7).

Figura 7 – Extrações de DNA total de colônias transformantes com o plasmídeo pCMP1 (complementação).

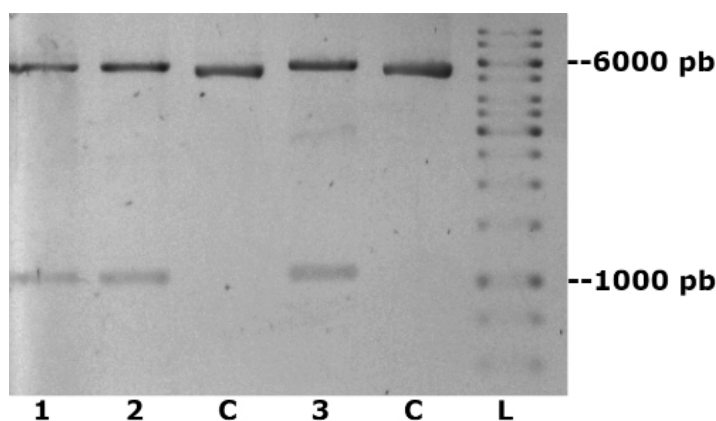
Foi feita extração de DNA total de colônias selecionadas depois da transformação para verificação dos tamanhos dos plasmídeos em comparação ao controle negativo (pGCD21 circular intacto) por eletroforese em gel de agarose 0,7%. **Números 1-8:** colônias transformantes com plasmídeo pCMP1; as colônias com banda plasmidial mais alta do que o controle são clones positivos; **C:** controle negativo com plasmídeo pGCD21 circular intacto; **L:** padrão de massa molecular; **seta:** bandas correspondentes aos vetores.



Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa Pixlr Editor.

Colônias positivas tiveram seu DNA plasmidial extraído para a realização de análise de restrição (Figura 8), a fim de confirmar a clonagem de *mreB* em pCMP1. A análise de restrição foi feita pela clivagem com as enzimas *XhoI* e *XbaI*. Foram observadas as bandas esperadas, que consistem no plasmídeo pGCD21 (5900 pb) e no gene *mreB* (1100 pb) separados (Figura 8). Estes clones foram sequenciados.

Figura 8 – Análise de restrição do plasmídeo pCMP1 por clivagem com as enzimas *XhoI* e *XbaI*. Colônias transformantes com o plasmídeo pCMP1 tiveram seu DNA plasmidial extraído para a realização de análises de restrição que foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,7%. **Números 1-3:** DNA plasmidial extraído de clones positivos e clivado com *XhoI* e *XbaI*, mostrando uma banda de 1100 pb (gene *mreB*) e uma banda de 5900 pb (vetor pGCD21 linear); **C:** controles negativos com pCMP1 intacto; **L:** padrão de massa molecular.



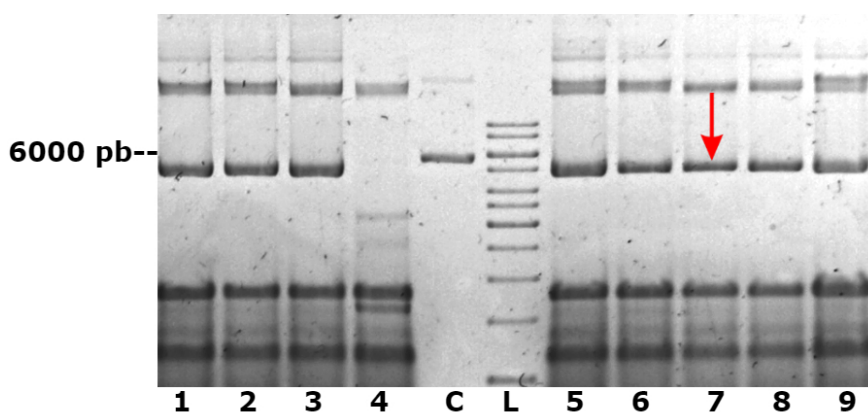
Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa Pixlr Editor.

Para realização da deleção em *X. citri* complementada, foi necessário transformar *X. citri* com dois vetores diferentes, e para que fosse possível selecionar células transformantes em cada etapa, são requeridos genes de resistência distintos em cada vetor. Adicionalmente, como *X. citri* é naturalmente resistente à ampicilina, este gene não pode ser usado como marca de seleção nesta bactéria. Como o vetor de deleção (descrito na próxima seção) contém o gene de resistência à canamicina, o vetor de complementação deveria ter outra marca de seleção. Portanto, o plasmídeo pCMP1 ainda passou por clivagem, perdendo os genes de resistência à canamicina e ampicilina, e ligação ao gene de resistência à gentamicina, transformando-se no vetor pCMP2.

A ligação feita para produzir pCMP2 foi transformada em *E. coli* e as células foram inoculadas em meio sólido com gentamicina para seleção. As colônias selecionadas tiveram seu DNA total extraído para análise por eletroforese em gel de agarose 0,7% (Figura 9), a fim de verificar o tamanho do vetor dos transformantes. Os clones positivos deveriam mostrar uma banda plasmidial de tamanho menor que a do controle pCMP1, uma vez que o vetor pCMP2 é 600 pb menor. Foi possível observar que todas as colônias testadas foram positivas (Figura 9).

Figura 9 – Extrações de DNA total de colônias transformantes com o plasmídeo pCMP2 (vetor de complementação final).

Foi feita extração de DNA total de colônias selecionadas depois da transformação para verificação das massas dos plasmídeos em comparação ao controle negativo (pCMP1 circular intacto) por eletroforese em gel de agarose 0,7%. **Números 1-9:** colônias transformantes com o plasmídeo pCMP2, sendo que as transformantes positivas possuem banda plasmidial de tamanho menor do que o controle; **C:** controle negativo pCMP1 circular intacto; **L:** padrão de massa molecular; **Seta:** bandas correspondentes aos vetores;



Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa Pixlr Editor.

Três clones positivos do plasmídeo pCMP2 ainda passaram por uma etapa de análise de restrição com as enzimas *XhoI* e *XbaI* para confirmação. Foram observadas as bandas esperadas: vetor pCMP2 sem *mreB* (5300 pb) e inserto *mreB* isolado (1100 pb).

3.7.3. Construção do vetor de deleção pCMP3

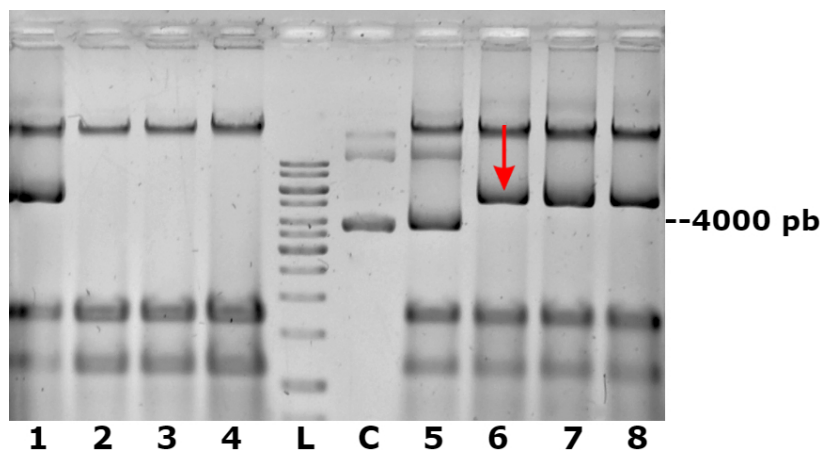
Para a construção do vetor de deleção pCMP3, as sequências de DNA adjacentes às extremidades 5' (*upstream*) e 3' (*downstream*) do gene *mreB* de *X. citri* foram individualmente ligadas ao vetor pJET 1.2. Para a construção do vetor pCMP3 os dois fragmentos foram retirados de seus respectivos vetores pJET 1.2 sequenciados. O vetor com o inserto *upstream* foi clivado com as enzimas *HindIII* e *KpnI* e o vetor com o inserto *downstream* foi clivado com as enzimas *EcoRI* e *KpnI*. As reações de clivagem passaram por eletroforese em gel de agarose 0,7% e as bandas nos tamanhos esperados foram purificadas a partir do gel.

O vetor pNPTS138 foi clivado com as enzimas *HindIII* e *EcoRI* e ligado simultaneamente aos insertos purificados *upstream* e *downstream*, gerando o vetor de deleção pCMP3. A ligação foi usada para transformação de *E. coli*. Colônias selecionadas em placa com canamicina, marca de pCMP3, tiveram seu DNA total extraído para análise sob eletroforese em gel de agarose 0,7% (Figura 10), para verificação do tamanho do vetor presente nas colônias em comparação ao controle negativo (pNPTS138 intacto).

Figura 10 – Extrações de DNA total de colônias transformantes com o plasmídeo pCMP3 (vetor de deleção).

Foi feita extração de DNA total de colônias selecionadas depois da transformação para verificação dos tamanhos dos plasmídeos em comparação ao controle negativo (pNPTS138 circular intacto).

Números 1-8: colônias transformantes com o plasmídeo pCMP3, sendo as transformantes positivas aquelas com banda plasmidial mais alta do que o controle; **C:** controle negativo com pNPTS138 circular intacto; **Seta:** bandas correspondentes aos plasmídeos.



Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa Pixlr Editor.

Foram selecionados três clones positivos de pCMP3 para passarem por análise de restrição, como forma de confirmação da construção planejada. Todas as reações de clivagem de pCMP3 produziram as bandas esperadas. Em seguida estes clones foram sequenciados.

3.7.4. Deleção do gene *mreB* em *X. citri* selvagem

Foi feita a eletroporação da linhagem selvagem de *X. citri* com o vetor de deleção pCMP3 e em seguida as células foram selecionadas em meio com canamicina. Nesta primeira etapa foram selecionadas células que integraram o vetor no genoma por um único evento de recombinação. Em seguida, 3 transformantes foram inoculados em meio líquido e incubados sob agitação a 200 rpm por um período de 16 horas. Em seguida, as culturas foram inoculadas em NYG com 3% de sacarose, para a seleção de mutantes com deleção de *mreB*. Na presença de sacarose os mutantes que tenham integrado o plasmídeo pCMP3 no genoma por um único evento de recombinação serão eliminados, devido à presença de *sacB* no vetor (WOLK, C. PETER; CAY, 1990; BRAMUCCI; NAGARAJAN, 1996). Colônias selecionadas nas placas com sacarose foram usadas como molde para PCR de

colônia com os primers *mreBupF* e *mreBdownR*, que amplificam as regiões flanqueadoras e o gene *mreB*, quando presente (caso das *X. citri* selvagens). Essas reações passaram pelos ciclos descritos na Tabela 5 (PCR7).

Tabela 5 – Ciclos de PCR

Repetições	Etapa	PCR7
1	Desnaturação inicial	94 °C – 5 min.
35	Desnaturação	94 °C – 40 seg.
	Anelamento	60 °C – 1 min.
	Extensão	72 °C – 3 min.

3.7.5. Deleção do gene *mreB* em *X. citri* complementadas

Células de *X. citri* foram transformadas por eletroporação com o vetor de complementação pCMP2 e selecionadas em meio com gentamicina. Em seguida foi feita a eletroporação da linhagem de *X. citri* complementada com o vetor pCMP3 e depois as células foram selecionadas em meio com canamicina. Então 3 transformantes foram cultivados em meio líquido com adição de 0,01% de arabinose e incubados sob agitação a 200 rpm por um período de 16 horas. Nesta etapa pode ocorrer naturalmente um segundo evento de recombinação que promove a deleção de *mreB*, enquanto a arabinose induz a expressão do *mreB* integrado em *amy*. Em seguida, as culturas foram inoculadas em NYG com 3% de sacarose e 0,01% de arabinose, para a seleção de mutantes que tenham passado por dupla recombinação. Colônias que foram selecionadas nas placas com 3% de sacarose foram usadas como molde para PCR de colônia, que passaram pelos mesmos ciclos usados com *X. citri* selvagem (Tabela 5).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

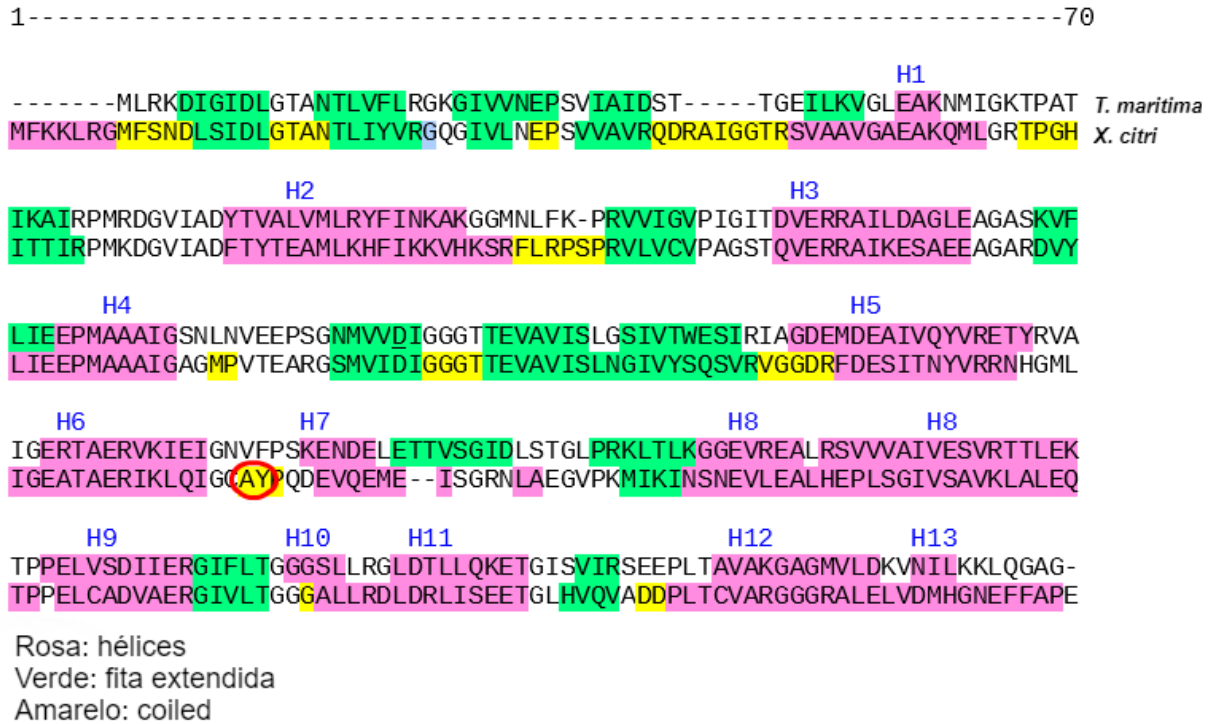
4.1. Marcação de MreB com GFP

4.1.1. Estrutura secundária aproximada de MreB de *X. citri*

De acordo com Swulius e Jensen (2012), em *E. coli* a fusão de MreB com proteínas fluorescentes na extremidade N-terminal pode alterar sua função e produzir artefatos sob microscopia. A alteração na função deve-se à existência, na região N-terminal de MreB de *E. coli* e *Thermotoga maritima*, de uma região essencial para a interação da proteína com a membrana citoplasmática (SALJE et al., 2011). Em contrapartida, foi demonstrado que a inserção da proteína fluorescente em uma região pouco conservada no interior de MreB não produz artefatos (SWULIUS; JENSEN, 2012) e gera uma proteína funcional (BENDEZÚ et al., 2009; URSELL et al., 2014). Portanto, foi seguida a estratégia de fusão em “sanduíche” utilizada por Bendezú et al. (2009). A determinação da estrutura secundária aproximada de MreB de *X. citri* foi feita pela coleta e alinhamento de previsões de estrutura geradas por ferramentas disponíveis online. A decisão do tipo de estrutura secundária para cada região da proteína foi feita com base na coincidência na estrutura secundária mais provável gerada pelas diferentes ferramentas. Uma vez obtido um consenso para toda a proteína, foi feita a sobreposição manual da estrutura secundária de MreB de *X. citri* com MreB de *Thermotoga maritima* (ENT; AMOS; LÖWE, 2001) (Figura 11) e foram estimadas as localizações das hélices correspondentes na proteína de *X. citri*. A inserção de GFP foi feita entre as hélices 6 e 7, entre os aminoácidos número 226 (A) e 227 (Y) (Figura 11).

Figura 11 – Determinação da estrutura secundária de *X. citri* (cores) e sobreposição com a estrutura secundária de *Thermotoga maritima*.

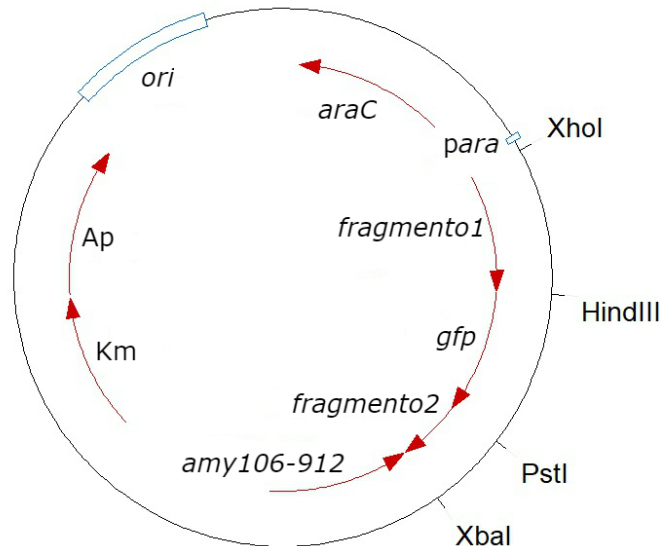
Foi feita a determinação da estrutura secundária de MreB de *X. citri* utilizando ferramentas de previsão de estrutura secundária disponíveis online; uma vez obtido um consenso entre as previsões geradas, foi feito um alinhamento da sequência de aminoácidos de MreB de *X. citri* com MreB de *Thermotoga maritima*. Depois foi feita a sobreposição da estrutura secundária de MreB de *X. citri* com MreB de *Thermotoga maritima*. A numeração das hélices está indicada em azul. A inserção de GFP foi feita entre as hélices 6 e 7, entre aminoácidos número 226 e 227, circulado em vermelho.



O vetor pCMP4 (Figura 12) sintetizado quimicamente pela FastBio foi transformado em *X. citri* por eletroporação. Colônias transformantes foram repicadas em placas de NYG 0,2% de amido para que fosse feito o teste do amido, a fim de determinar o sítio de inserção de pCMP4 no cromossomo. De todas as 40 colônias testadas, nenhuma produziu halo de degradação de amido, indicando que o vetor foi inserido no locus *amy* em todas (Figura 13). Esse resultado é coerente com a hipótese de que *mreB* é essencial para *X. citri*, pois a recombinação e inserção de um vetor em uma região essencial do genoma provavelmente é prejudicial para o microrganismo.

Figura 12 – Vetor de pCMP4 com seus principais sítios de restrição e características.

ori: origem de replicação; Km: gene de resistência à canamicina; Ap: gene de resistência à ampicilina; *amy106-912*: fragmento do gene da α -amilase de *X. citri* que permite integração no *locus amy* por recombinação; *araC*: repressor de arabinose; *para*: promotor de arabinose. *fragmento1*: primeira parte do gene *mreB* de *X. citri* (aminoácidos 1 ao 226 da proteína MreB); *gfp*: gene da proteína GFP; *fragmento2*: segunda parte do gene *mreB* de *X. citri* (aminoácidos 227 ao 348 da proteína MreB);

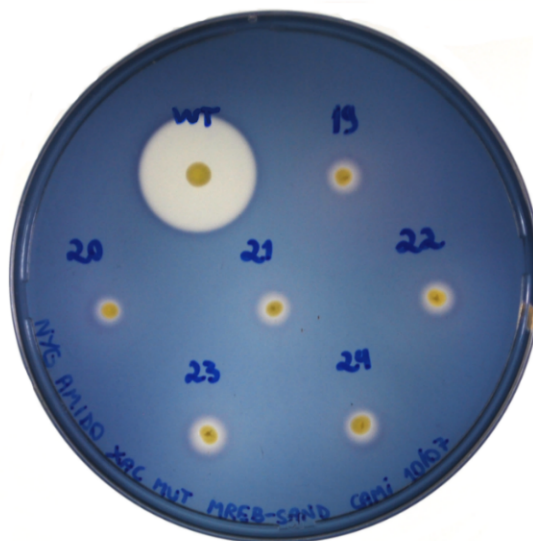


Fonte: imagem produzida com o software Clone Manager v. 6.

Figura 13 – Teste do amido com colônias transformantes com o vetor pCMP4.

Colônias transformantes com pCMP4 foram inoculadas em meio NYG sólido com 0,2% de amido para realização do teste de degradação de amido; a existência de halo de degradação indica interrupção do gene da α -amilase e foi detectada pela exposição da placa a vapor de iodo.

Números 19-24: colônias transformantes para o plasmídeo pCMP4, a ausência de halo de degradação indica inserção do vetor no gene *amy*; **WT:** Linhagem selvagem 306 de *X. citri* com halo de degradação de amido normal.



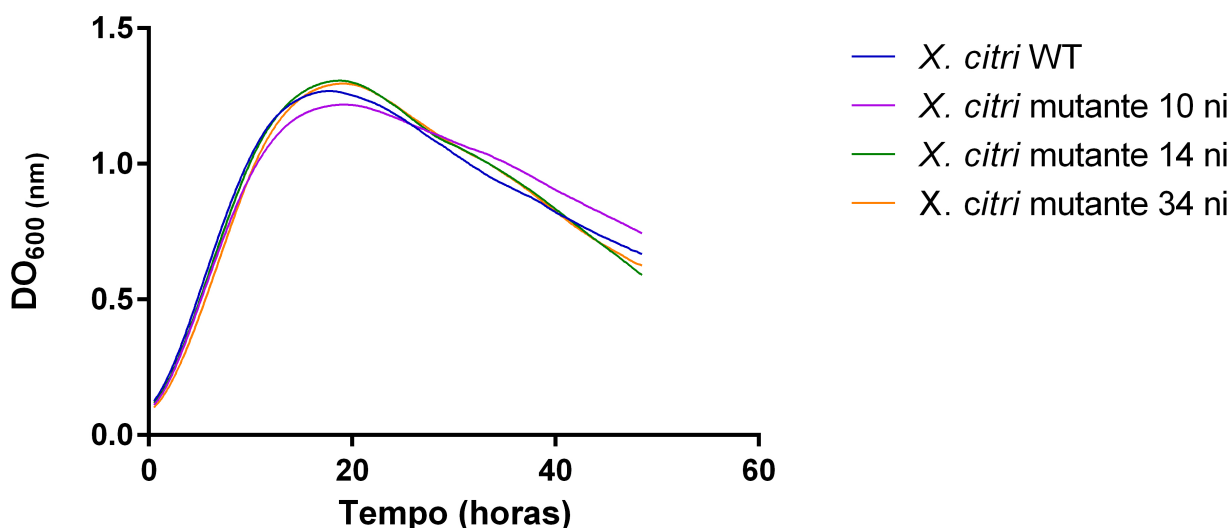
Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa Pixlr Editor.

4.1.2. Curvas de crescimento populacional de mutantes *X. citri amy::pCMP4*

Foram selecionados 3 linhagens de *X. citri* que integraram o vetor pCMP4 no cromossomo (*X. citri amy::pCMP4*) para serem caracterizadas e observadas por microscopia. A fim de investigar se a inserção de pCMP4 em *amy* causou alterações significativas no padrão de crescimento de *X. citri*, foram montadas curvas de crescimento populacional com os mutantes *X. citri amy::pCMP4*, junto com *X. citri* selvagem. Para isso, as linhagens foram incubadas *overnight* em meio NYG e tiveram a D.O._{600nm} ajustada para ~0,1 no momento de início da curva. O leitor de placas foi programado para realizar leituras a cada 30 minutos por 48 horas (Figura 14). Foi possível observar que houve pouca alteração no padrão de crescimento dos mutantes em comparação com a *X. citri* selvagem, o que mostra que a divisão celular e o metabolismo geral da célula foram pouco afetados pela integração de pCMP4 em *amy*.

Figura 14 – Curvas de crescimento populacional de mutantes *X. citri amy::pCMP4* não induzidos em comparação à *X. citri* selvagem.

As linhagens foram incubadas *overnight* em meio NYG e tiveram a D.O._{600nm} ajustada para ~0,1 no momento de início da curva. Leituras de D.O._{600nm} foram feitas a cada 30 minutos por 48 horas; ni: não induzido por arabinose.



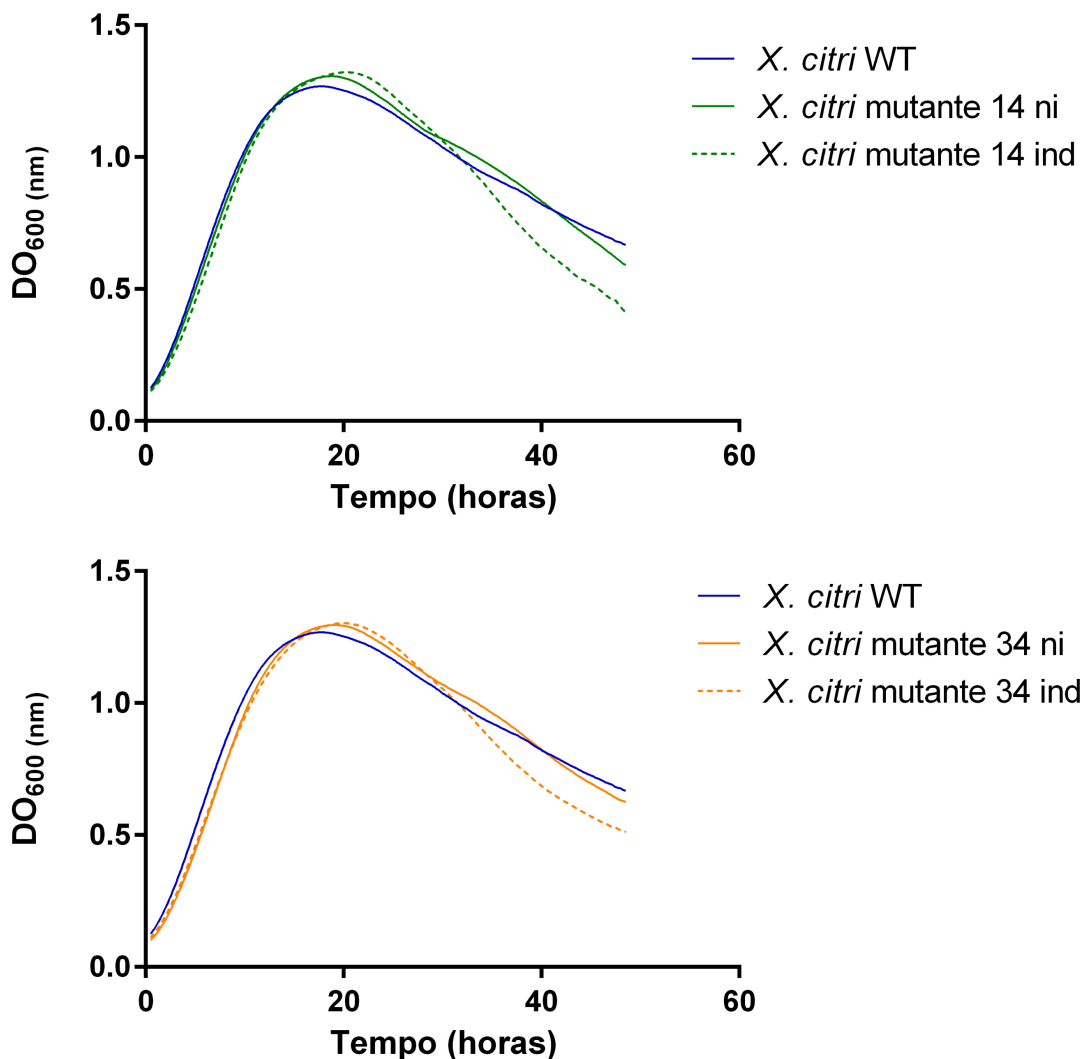
Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

Concomitantemente, foram construídas curvas de crescimento dos mutantes *X. citri amy::pCMP4* em condição de indução por 0,03% de arabinose (Figura 15). Nesta condição a curva de crescimento de *X. citri amy::pCMP4* também desviou-se

pouco daquela da *X. citri* selvagem, indicando que a expressão da fusão em sanduíche MreB-GFP não alterou significativamente o padrão de crescimento dos mutantes. A curva dos mutantes em condição de indução diferenciou-se da curva sem indução apenas na fase de morte, quando os mutantes parecem ter declínio populacional mais acentuado. O padrão de crescimento pouco alterado destes mutantes indica que a localização subcelular de *mreB* poderá ser estudada em células metabolicamente muito similares a *X. citri* selvagem.

Figura 15 – Curvas de crescimento populacional de mutantes *X. citri amy::pCMP4* em condição não-induzida e induzida por arabinose 0,03%.

As linhagens foram cultivadas *overnight* em meio NYG e em seguida as culturas tiveram a D.O. $_{600nm}$ ajustada para $\sim 0,1$ e arabinose 0,03% adicionada no momento de início da curva. Leituras de D.O. $_{600nm}$ foram feitas a cada 30 minutos por 48 horas; **ni**: não induzido por arabinose; **ind**: induzido com 0,03% de arabinose.



Fonte: gráfico produzido com o programa Graphpad Prism v. 6.

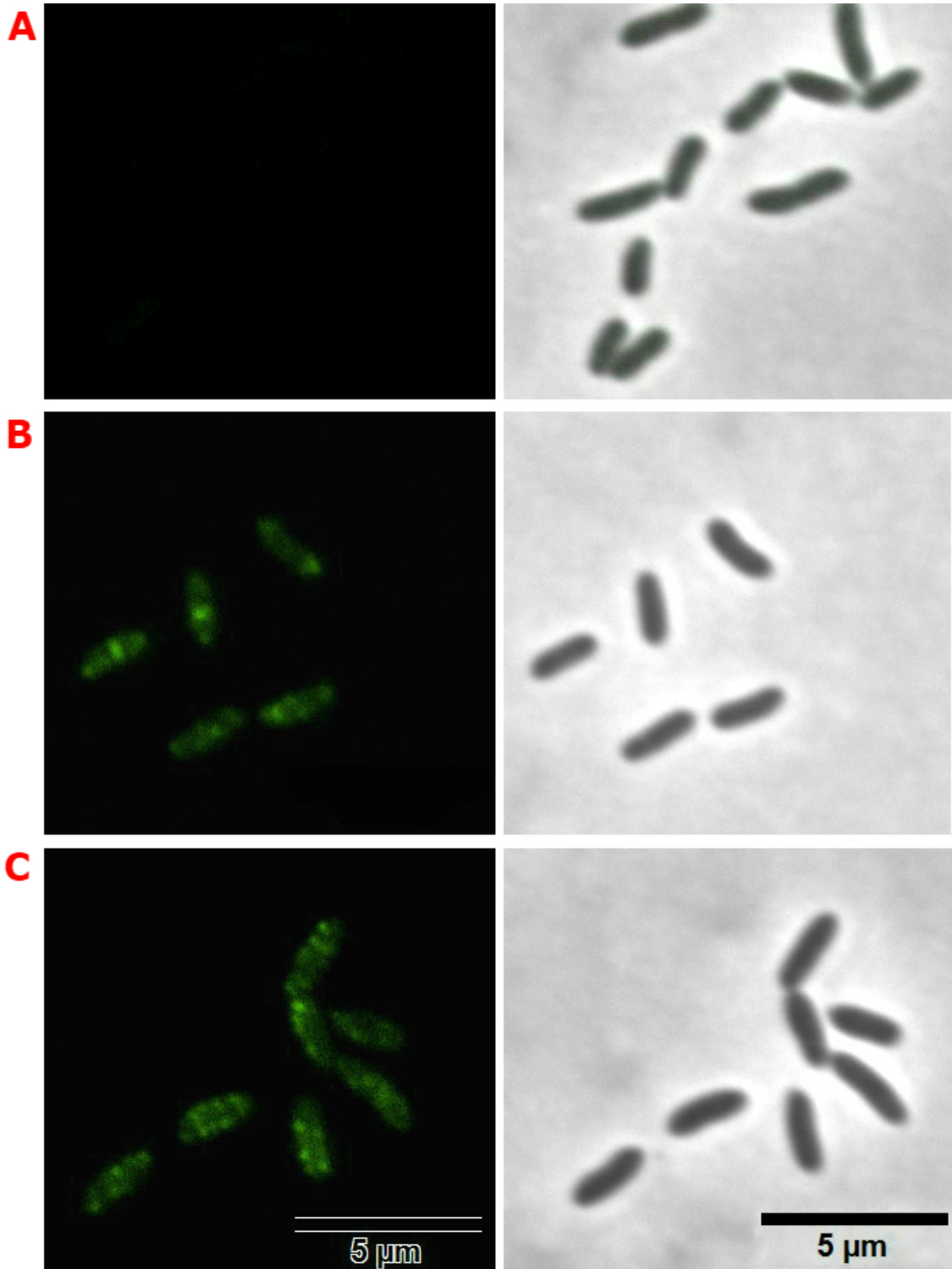
4.1.3. Microscopia de mutantes *X. citri amy::pCMP4*

Células de *X. citri amy::pCMP4* foram observadas por microscopia de fluorescência e contraste de fase para verificação do funcionamento do sistema de expressão da fusão em sanduíche MreB-GFP e para a investigação de sua morfologia geral. Para as observações por microscopia, os mutantes *X. citri amy::pCMP4* foram cultivados em meio NYG até atingirem D.O._{600nm} ~0,3 momento no qual as culturas foram induzidas com 0,03% de arabinose. Foram feitas observações dos mutantes número 34 e 14, com a obtenção de imagens similares.

As observações por microscopia feitas com os mutantes (Figura 14) mostraram que: (1) as células mantiveram a forma de bastonete na condição induzida e não induzida (2) a fluorescência é indetectável na ausência de indução, o que é um sinal de controle eficiente da expressão pelo promotor; (3) a fluorescência detectada na condição de indução com arabinose 0,03% mostra que a fusão MreB-GFP está sendo expressada como esperado; (4) a fluorescência de MreB-GFP parece se concentrar em manchas predominantemente na periferia celular, mas ocorrem também em outras regiões.

O padrão de localização de MreB observado com microscopia de fluorescência destes mutantes (Figura 16) é similar ao padrão de localização de MreB descrito para outras bactérias na literatura (BENDEZÚ et al., 2009; DOMÍNGUEZ-ESCOBAR et al., 2011; JONES; CARBALLIDO-LÓPEZ; ERRINGTON, 2001). Jones et al. (2001) e Domínguez-Escobar et al. (2011) observaram esse padrão de localização em *Bacillus subtilis* utilizando microscopia de imunofluorescência e microscopia de fluorescência, respectivamente. Bendezú et al. (2009) produziu uma fusão em sanduíche de MreB em *Escherichia coli* que gerou imagens de microscopia de fluorescência parecidas com as mostradas na figura 16. Pode ser vista uma comparação na figura 17. É possível enxergar nas imagens até mesmo um padrão sugestivo da distribuição de MreB como filamentos em forma de hélice, relatada em trabalhos pioneiros como o de Jones et al. (2001), apesar de já ter sido demonstrado que essa é uma interpretação incorreta (SWULIUS; JENSEN, 2012). Essas similaridades podem ser indícios de que o padrão de localização de MreB em *X. citri* é igual àquele observado em *E. coli* e *B. subtilis*.

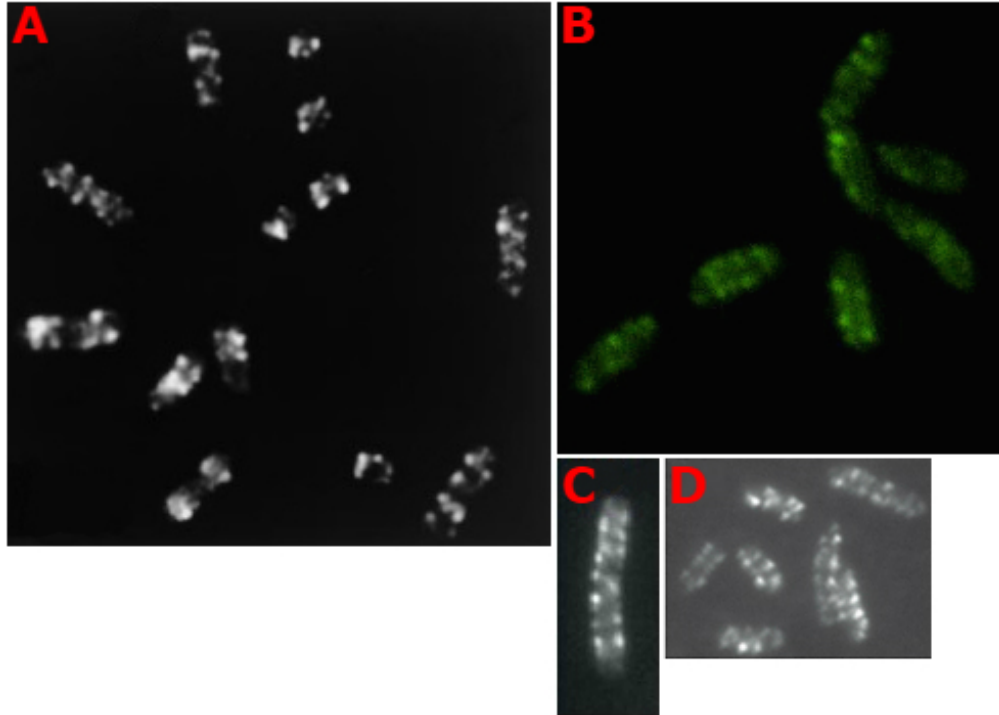
Figura 16 – Microscopia de fluorescência e contraste de fase da linhagem *X. citri amy::pCMP4*. A linhagem mutante *X. citri amy::pCMP4* 34 foi induzida com arabinose 0,03% quando a cultura atingiu D.O._{600nm} ~0,3; as fotos à esquerda são de microscopia de fluorescência e as fotos à direita são de microscopia de contraste de fase em aumento de 100; **A)** condição de ausência de indução, 2 horas após ter atingido D.O._{600nm} ~0,3; **B)** 2 horas após a indução com 0,03% de arabinose; **C)** 4 horas após a indução com 0,03% de arabinose.



Fonte: fotos adquiridas e processadas com o programa CellSens Dimension 11 (Olympus).

Figura 17 – Comparação entre imagens do padrão de localização de MreB produzidas por outros autores com as obtidas neste trabalho.

- A)** Imagem de microscopia de imunofluorescência de MreB de *B. subtilis* produzidas por Jones et al. 2001;
- B)** Imagem de microscopia de fluorescência de *X. citri* expressando a fusão em sanduíche MrB-GFP original deste trabalho.
- C)** Imagem de microscopia de fluorescência de uma fusão MreB-GFP em *B. subtilis* produzida por Domínguez-Escobar et al. (2011);
- D)** Imagem de microscopia de fluorescência de *E. coli* expressando uma fusão em sanduíche MreB-RFP produzida por Bendezu et al. (2009).



Fonte: imagens adaptadas de Jones et al. (2001), Domínguez-Escobar et al. (2011) e Bendezu et al. (2009).

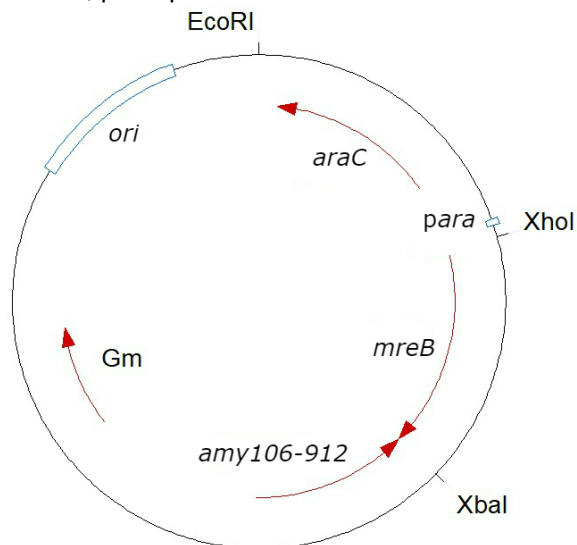
4.2. Deleção de *mreB*

4.2.1. Estratégia geral

Devido ao caráter essencial do gene *mreB* na maioria das bactérias (JONES; CARBALLIDO-LÓPEZ; ERRINGTON, 2001; FIGGE; DIVAKARUNI; GOBER, 2004; KRUSE; BORK-JENSEN; GERDES, 2005; ROBERTSON et al., 2007), optou-se pela estratégia de depleção proteica para o estudo funcional de MreB, como descrito por Lacerda et al. (2017). A depleção proteica é composta por uma etapa de complementação (Figura 18), seguida da deleção do gene nativo por dupla recombinação (Figura 19). Para verificação da essencialidade do gene *mreB* optou-se também pela tentativa de deleção em *X. citri* selvagem.

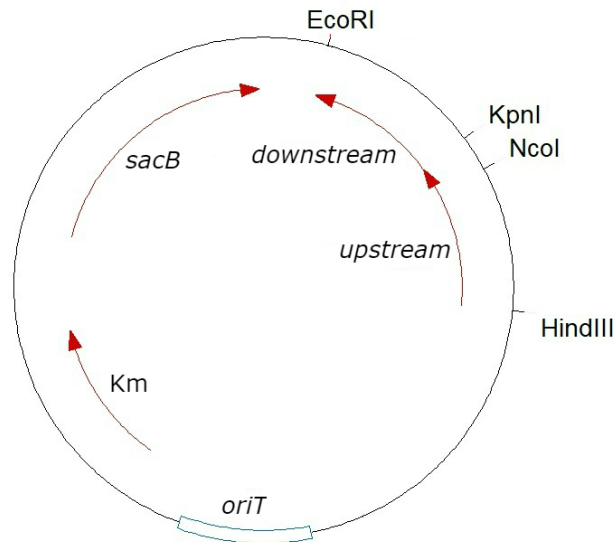
Figura 18 – Vetor de complementação pCMP2 com seus principais sítios de restrição e características.

ori: origem de replicação; *Gm*: gene de resistência à gentamicina; *amy106-912*: fragmento do gene da α -amilase de *X. citri* que permite integração no *locus amy* por recombinação; *mreB*: gene *mreB* de *X. citri*; *araC*: repressor de arabinose; *para*: promotor de arabinose.



Fonte: imagem produzida com o software Clone Manager v. 6.

Figura 19 – Vetor de deleção pCMP3 com seus principais sítios de restrição e características. *oriT*: origem de replicação; Km: gene de resistência à canamicina; *downstream*: sequência adjacente à extremidade 3' de *mreB* de *X. citri*; *upstream*: sequência adjacente à extremidade 5' de *mreB* de *X. citri*; *sacB*: gene que codifica para a enzima levansucrase de *Bacillus subtilis*, que ao degradar sacarose, produz um composto tóxico para células gram-negativas.



Fonte: imagem produzida com o software Clone Manager v. 6.

4.2.2. Busca por *X. citri* selvagem com deleção de *mreB*

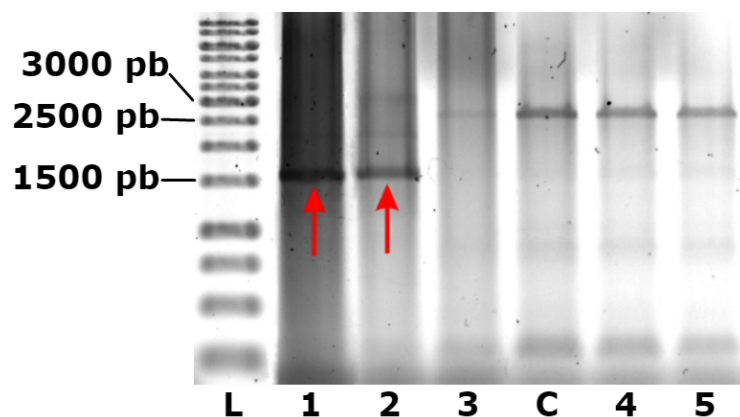
Após a eletroporação de *X. citri* com o vetor pCMP3 as células foram inoculadas em meio com canamicina, onde foram selecionadas bactérias que integraram o vetor no cromossomo por um evento de recombinação. Em seguida, 3 colônias transformantes foram cultivadas em meio líquido sem antibióticos. Nesta etapa pode ocorrer naturalmente um segundo evento de recombinação que promove a deleção. Então, as culturas foram diluídas e inoculadas em placas com 3% de sacarose, para a seleção de mutantes que tenham passado por dupla recombinação. Os mutantes que tenham integrado o plasmídeo de deleção pCMP3 no genoma são eliminados em sacarose, pois este vetor carrega o gene *sacB* de *Bacillus subtilis*, que tem efeito letal para gram-negativas em presença de sacarose (WOLK, C. PETER; CAY, 1990; BRAMUCCI; NAGARAJAN, 1996).

Colônias selecionadas nas placas com 3% de sacarose foram usadas como molde para PCR de colônia. As *X. citri* selvagens devem exibir uma banda de aproximadamente 2600 pb (regiões flanqueadoras mais gene *mreB*), enquanto as *X.*

citri com deleção de *mreB* devem exibir uma banda de aproximadamente 1570 pb (apenas regiões flanqueadoras). Foram identificadas 2 colônias em um total de 170 que geraram bandas diagnósticas da deleção de *mreB* (1 e 2 na Figura 20). Essas colônias cresceram ao serem inoculadas em canamicina, o que indica a presença do vetor. Portanto, não foram obtidas *X. citri* com deleção de *mreB* por esta estratégia, o que confirmou que *mreB* é essencial para *X. citri*.

Figura 20 – PCRs de colônia para identificação de *X. citri* com deleção de *mreB*.

Colônias que foram selecionadas nas placas com 3% de sacarose foram usadas como molde para PCR com primers que amplificam as regiões flanqueadoras (816 pb e 750 pb) mais o gene *mreB* (1100 pb), quando presente; as reações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,7%. **C:** PCR controle negativo feito com células de *X. citri* selvagem, mostrando uma banda de 2600 pb; **L:** padrão de massa molecular; **Números 1 e 2:** PCRs de colônia exibindo uma banda 1570 pb diagnóstica de deleção de *mreB*; **Números 3-5:** PCRs de colônias exibindo uma banda de 2600 pb;



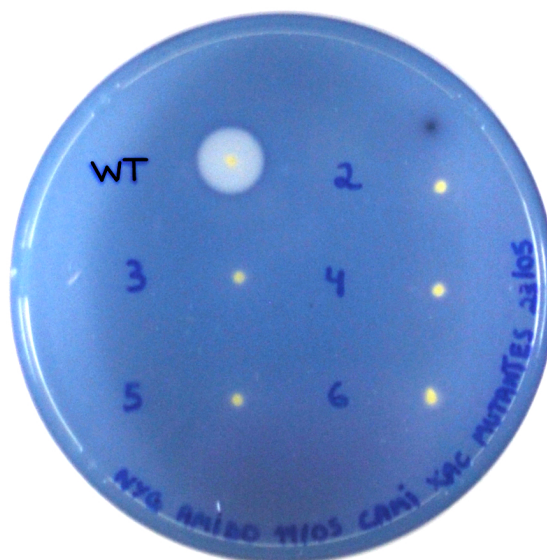
Fonte: imagens adquiridas com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editadas com o programa Pixlr Editor.

4.2.3. Integração do vetor de complementação em *X. citri*

Células de *X. citri* foram eletroporadas com pCMP2 e colônias transformantes foram inoculadas em meio NYG sólido com 0,2% para realização do teste de degradação de amido (Figura 21). Os mutantes que integraram o plasmídeo pCMP2 por recombinação no locus *amy* (*X. citri amy::pCMP2*) não produzem halo de degradação do amido devido à interrupção do gene que codifica para a enzima α -amilase. Novamente, não foram obtidas linhagens com integração do plasmídeo no gene *mreB*, o que pode ter relação com a sua essencialidade. Alguns dos mutantes *X. citri amy::pCMP2* foram selecionados para a etapa de deleção.

Figura 21 – Teste de degradação de amido para verificação do local de integração do vetor de complementação pCMP2.

Colônias transformantes com pCMP2 foram inoculadas em meio NYG sólido com 0,2% de amido para realização do teste de degradação de amido; a existência de halo de degradação foi detectada pela exposição da placa a vapor de iodo. **WT**: controle positivo com colônia de *X. citri* tipo selvagem; **Números 2-6**: colônias de *X. citri* transformadas com o vetor de complementação pCMP2, a ausência de halo indica que houve inserção de pCMP2 em *amy* (gene da α -amilase).



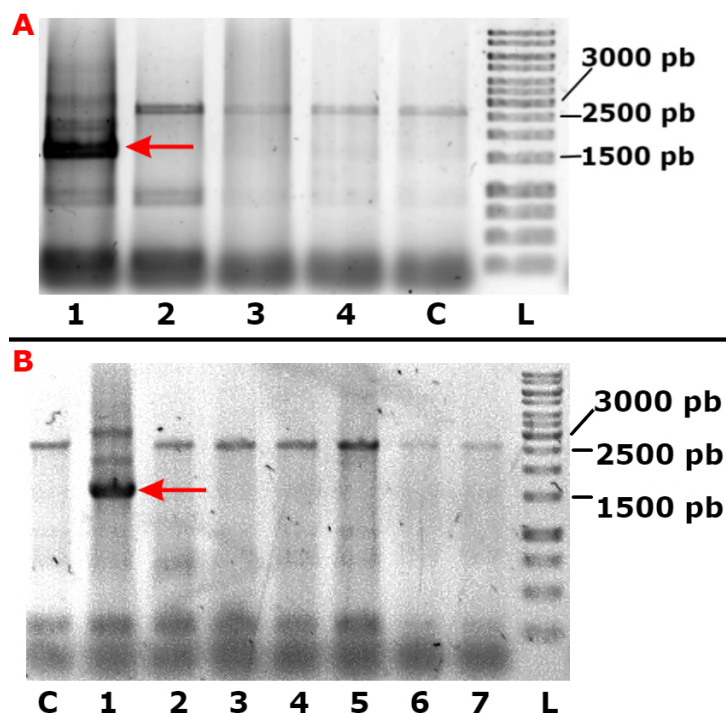
Fonte: imagem adquirida com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editada com o programa Pixlr Editor.

4.2.4. Busca por *X. citri* complementadas com deleção de *mreB*

Foi feita a eletroporação de *X. citri amy::pCMP2* com o vetor pCMP3 e as células passaram pelas mesmas etapas de seleção já mencionadas. A única diferença foi a utilização de meio com 0,03% de arabinose a partir da etapa de crescimento sem antibióticos, para induzir a expressão de *mreB* integrado em *amy*. Colônias selecionadas nas placas com 3% de sacarose foram usadas como molde para PCR de colônia para busca de *X. citri ΔmreB amy::pCMP2*. As *X. citri* selvagens devem exibir uma banda de aproximadamente 2600 pb (regiões flangeadoras mais gene *mreB*), enquanto as *X. citri* com deleção de *mreB* devem exibir uma banda de aproximadamente 1570 pb (apenas regiões flangeadoras). Foram identificadas 2 colônias em um total de 170 que geraram bandas diagnósticas da deleção de *mreB* (Figura 22 A e B).

Figura 22 A e B – PCRs de colônia para identificação de *X. citri* Δ *mreB* *amy*::pCMP2 com deleção de *mreB*.

A e B: Colônias que foram selecionadas nas placas com 3% de sacarose foram usadas como molde para PCR com primers que amplificam as regiões flanqueadoras (816 pb e 750 pb) mais o gene *mreB* (1100 pb), quando presente; as reações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,7%. **C:** PCR controle negativo feito com células de *X. citri* selvagem, mostrando uma banda de 2600 pb; **L:** padrão de massa molecular; **Número 1A e 1B:** PCRs de colônia exibindo uma banda 1570 pb diagnóstica de deleção de *mreB*; **Números 2-4 A:** PCRs de colônias exibindo uma banda de 2600 pb; **Números 2-7 B:** PCRs de colônias exibindo uma banda de 2600 pb.



Fonte: imagens adquiridas com o programa Camera Control Pro 2 (Nikon) e editadas com o programa Pixlr Editor.

Quando o PCR de colônia de um dos mutantes (Número 1-A, Figura 22) foi repetido, o mesmo resultado não foi reproduzido, mas no caso do outro (Número 1-B, Figura 22) sim. Uma hipótese foi proposta para explicar esses resultados conflitantes: há presença do vetor ou parte dele no genoma, o que possibilitaria a amplificação tanto da banda diagnóstica quanto da selvagem, concomitantemente com algum evento que eliminou o efeito letal de *sacB* para *X. citri* em meio com sacarose. As duas linhagens apresentaram crescimento em canamicina, corroborando a hipótese de presença do vetor na célula. Como teste adicional para essa hipótese, foi feito o mesmo PCR com uma colônia de *X. citri* *amy*::pCMP2 que havia integrado o vetor pCMP3 no genoma por um evento de recombinação, e as bandas amplificadas foram idênticas aquelas mostradas na Figura 22 para os números 1-A e 1-B.

A estratégia de complementação e deleção aqui descrita mostrou-se eficaz quando aplicada ao gene *parB* de *X. citri* por Lacerda et al. (2017). Entretanto, *parB* foi classificado como um gene não essencial, sendo essa uma diferença importante. Logo, a impossibilidade de obtenção de *X. citri* $\Delta mreB$ *amy::pCMP2* por esta estratégia é uma evidência adicional da essencialidade de *mreB*, mas isso não necessariamente invalida o método escolhido. Avaliou-se que o resultado obtido é mais provavelmente explicado pelo fato de a complementação feita não ter sido adequada para garantir a viabilidade das células. Neste caso, a expressão de *mreB* integrado em *amy* sob controle do promotor *ara* pode ter sido excessiva ou insuficiente. Existe ainda a possibilidade de alguma característica da região genômica onde se situa *mreB* impedir ou dificultar a sua deleção por dupla recombinação.

5. CONCLUSÕES

As imagens de microscopia e as curvas de crescimento obtidas de mutantes *X. citri amy::pCMP4* mostraram sucesso na expressão da fusão em sanduíche sem efeitos nocivos detectáveis para as células. As imagens de microscopia de fluorescência revelaram, pela primeira vez, o padrão de localização subcelular de MreB em *X. citri*, evidenciando sua similaridade àquele observado em *B. subtilis* e *E. coli*. Esses dados confirmam a identidade de *mreB* em *X. citri* e são as primeiras evidências de que a proteína MreB de *X. citri* pode ter um funcionamento e dinâmica também similares aos relatados em outras bactérias. O vetor pCMP4 desenvolvido neste trabalho poderá ser utilizado futuramente para determinar a relação entre MreB e outras proteínas de *X. citri* por microscopia de fluorescência.

Os experimentos de deleção comprovaram que o gene *mreB* é essencial para *X. citri*, pois não foi possível deletar *mreB* tanto na presença, como na ausência de complementação. A impossibilidade de obtenção de *X. citri* com deleção de *mreB* pode indicar que o sistema de complementação de *mreB* introduzido na célula não é adequado para garantir a sua viabilidade por ter um nível de expressão diferente do natural. Outra possível explicação é que alguma característica da região onde se situa o gene no genoma de *X. citri* tenha impedido ou dificultado o segundo evento de recombinação, impossibilitando assim a deleção por este método.

Os resultados aqui apresentados tem relevância para futuras avaliações de compostos antimicrobianos para controle do cancro cítrico. A proteína MreB de *X. citri* revelou-se um bom alvo para tais compostos devido à sua essencialidade. Além disso, o vetor com a fusão MreB-GFP poderá ser utilizado como ferramenta para avaliar os mecanismos de ação de diferentes compostos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- AMOS, L. A.; VAN DEN ENT, F.; LÖWE, J. Structural/functional homology between the bacterial and eukaryotic cytoskeletons. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 1, p. 24–31, 2004.
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J. Current status of citrus canker control in São Paulo state, Brazil: A new chapter in a 50-year book. In: WORKSHOP ON XANTHOMONAS CITRI/CITRUS CANCKER, v. 1, 2011, Ribeirão Preto, SP, p. 14-16.
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J. **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Araraquara, Brazil: Fundecitrus, 2014.
- BEHLAU, F.; BELASQUE, J.; BERGAMIN FILHO, A.; GRAHAM, J. H.; LEITE, R. P.; GOTTWALD, T. R. Copper sprays and windbreaks for control of citrus canker on young orange trees in southern Brazil. **Crop Protection**, v. 27, n. 3–5, p. 807–813, 2008.
- BELASQUE JR., J.; FERNANDES, N. G.; MASSARI, C. A. O sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 91–92, 2009.
- 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.
- BENDEZÚ, F. O.; HALE, C. A.; BERNHARDT, T. G.; DE BOER, P. A. J. RodZ (YfgA) is required for proper assembly of the MreB actin cytoskeleton and cell shape in *E. coli*. **EMBO Journal**, v. 28, n. 3, p. 193–204, 2009.
- BRAMUCCI, M. G.; NAGARAJAN, V. Direct selection of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on sucrose-induced lethality. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 3948–3953, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 291, de 23 de Julho de 1997. Aprova as Normas a serem adotadas pela Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico – CANECC. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 Jul. 1997. Seção 1, pág. 15934 a 15936.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 37, de 5 de setembro de 2016. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 Set. 2016. Seção 1, pág. 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 21, de 25 de abril de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 Maio 2018. Seção 1, pág. 9.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: Breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.

CARBALLIDO-LÓPEZ, R.; FORMSTONE, A.; LI, Y.; EHRlich, S. D.; NOIROT, P.; ERRINGTON, J. Actin Homolog MreBH Governs Cell Morphogenesis by Localization of the Cell Wall Hydrolase LytE. **Developmental Cell**, v. 11, n. 3, p. 399–409, 2006.

CARVER, T.; HARRIS, S. R.; BERRIMAN, M.; PARKHILL, J.; MCQUILLAN, J. A. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464–469, 2012.

CERNADAS, R. A.; CAMILLO, L. R.; BENEDETTI, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 5, p. 609–631, 2008.

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.; CICARELLI, 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.

DAS, A. K. Citrus canker - a review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p. 52–60, 2003.

DE CARVALHO, S. A.; DE CARVALHO NUNES, W. M.; BELASQUE, J.; MACHADO, M. A.; CROCE-FILHO, J.; BOCK, C. H.; ABDO, Z. Comparison of Resistance to Asiatic Citrus Canker Among Different Genotypes of Citrus in a Long-Term Canker-Resistance Field Screening Experiment in Brazil. **Plant Disease**, v. 99, n. 2, p. 207–218, 2015.

DIVAKARUNI, A. V.; BAIDA, C.; WHITE, C. L.; GOBER, J. W. The cell shape proteins MreB and MreC control cell morphogenesis by positioning cell wall synthetic complexes. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 174–188, 2007.

DOMÍNGUEZ-ESCOBAR, J.; CHASTANET, A.; CREVENNA, A. H.; FROMION, V.; WEDLICH-SÖLDNER, R.; CARBALLIDO-LÓPEZ, R. Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. **Science**, v. 333, n. 6039, p. 225–228, 2011.

DROZDETSKIY, A.; COLE, C.; PROCTER, J.; BARTON, G. J. JPred4: A protein secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W389–W394, 2015.

DUNGER, G.; GAROFALO, C. G.; GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; ROSA, M. C. P.; FARAH, C. S.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. Analysis of three *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* effector proteins in pathogenicity and their interactions with host plant proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 8, p. 865–876, 2012.

ENT, F. van den; AMOS, L. A.; LÖWE, J. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. **Nature**, v. 413, n. 9, p. 39–44, 2001.

ERRINGTON, J. Bacterial morphogenesis and the enigmatic MreB helix. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 4, p. 241–248, 2015.

FERREIRA, H.; BARRIENTOS, F. J. A.; BALDINI, R. L.; ROSATO, Y. B. Electrotransformation of three pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 651–655, 1995.

FIGGE, R. M.; DIVAKARUNI, A. V.; GOBER, J. W. MreB, the cell-shape determining bacterial actin homolog, coordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. **Genomics**, v. 51, n. 5, p. 1–47, 2004.

FORMSTONE, A.; CARBALLIDO-LÓPEZ, R.; NOIROT, P.; ERRINGTON, J.; SCHEFFERS, D. J. Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 5, p. 1812–1821, 2008.

FRANK BUQUICCHIO AND MICHAEL SPRUYT. **Gene Runner**, 2018.

GARNER, E. C.; BERNARD, R.; WANG, W.; ZHUANG, X.; RUDNER, D. Z.; MITCHISON, T. Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *Bacillus subtilis*. **Science**, v. 333, n. 6039, p. 222–225, 2011.

GEOURJON, C.; DELEAGE, G. Significant improvements in protein secondary structure prediction by prediction from multiple alignments. **Bioinformatics**, v. 11, n. 6, p. 681–684, 1995.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ZIMARO, T.; SGRO, G. G.; FICARRA, F. A.; DUNGER, G. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 196–204, 2010.

GOTTWALD, T. R.; BASSANEZI, R. B.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A. Spatial pattern analysis of citrus canker-infected plantings in São Paulo, Brazil, and augmentation of infection elicited by the asian leafminer. **Phytopathology**, v. 97, n. 6, p. 674–683, 2007.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 3, n. 1, 2002.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, D. T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular plant pathology**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004.

HOLTJE, J. V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 1, p. 181–203, 1998.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal, 2016. Acesso em: 20 de Abril de 2018.

JENKINS, C. L.; STARR, M. P. The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. **Current Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 323–326, 1982.

JONES, L. J. F.; CARBALLIDO-LÓPEZ, R.; ERRINGTON, J. Control of cell shape in bacteria. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 913–922, 2001.

KAWAI, Y.; DANIEL, R. A.; ERRINGTON, J. Regulation of cell wall morphogenesis in *Bacillus subtilis* by recruitment of PBP1 to the MreB helix. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 1131–1144, 2009.

KAWAI, Y.; MARLES-WRIGHT, J.; CLEVERLEY, R. M.; EMMINS, R.; ISHIKAWA, S.; KUWANO, M.; HEINZ, N.; BUI, N. K.; HOYLAND, C. N.; OGASAWARA, N.; LEWIS, R. J.; VOLLMER, W.; DANIEL, R. A.; ERRINGTON, J. A widespread family of bacterial cell wall assembly proteins. **EMBO Journal**, v. 30, n. 24, p. 4931–4941, 2011.

KIESLICH, C. A.; SMADBECK, J.; KHOURY, G. A.; FLOUDAS, C. A. ConSSert: Consensus SVM Model for Accurate Prediction of Ordered Secondary Structure. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 56, n. 3, p. 455–461, 2016.

KOPACZ, M. M.; LORENZONI, A. S. G.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; SCHEFFERS, D. J. Purification and characterization of FtsZ from the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **MicrobiologyOpen**, e00706, p. 1–11, 2018.

KRÓL, E.; DE SOUSA BORGES, A.; DA SILVA, I.; POLAQUINI, C. R.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D. J. Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 390, p. 1–12, 2015.

KRUSE, T.; BORK-JENSEN, J.; GERDES, K. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 78–89, 2005.

KRUSE, T.; GERDES, K.; LOBNER-OLESEN, A.; MØLLER-JENSEN, J. Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. **EMBO Journal**, v. 22, n. 19, p. 5283–5292, 2003.

KUMAR, T. A. CFSSP: Chou and Fasman Secondary Structure Prediction server. **Wide Spectrum**, v. 1, n. 9, p. 15–19, 2013.

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

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. I.; SILVA, A. C.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2009.

LEVIN, P. A.; MARGOLIS, P. S.; SETLOW, P.; LOSICK, R.; SUN, D. Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 21, p. 6717–6728, 1992.

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. 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.

LIN, K.; SIMOSSIS, V. A.; TAYLOR, W. R.; HERINGA, J. A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 152–159, 2005.

LORENZONI, A. S. G.; DANTAS, G. C.; BERGSMA, T.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D. J. *Xanthomonas citri* MinC oscillates from pole to pole to ensure proper cell division and shape. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–12, 2017.

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.

MOHAMMADI, T.; KARCZMAREK, A.; CROUVOISIER, M.; BOUHSS, A.; MENGIN-LECREULX, D.; DEN BLAAUWEN, T. The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1106–1121, 2007.

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.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE, 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, 2010.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. O retrato da citricultura brasileira. p. 138, 2010.

NILSEN, T.; YAN, A. W.; GALE, G.; MARCIA, B.; GOLDBERG, M. B. Presence of multiple sites containing polar material in spherical *Escherichia coli* cells that lack MreB. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 17, p. 6187-6196, 2005.

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

ROBERTSON, G. T.; DOYLE, T. B.; DU, Q.; DUNCAN, L.; MDLULI, K. E.; LYNCH, A. S. A novel indole compound that inhibits *Pseudomonas aeruginosa* growth by targeting MreB is a substrate for MexAB-OprM. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 19, p. 6870–6881, 2007.

RUEFF, A. S.; CHASTANET, A.; DOMÍNGUEZ-ESCOBAR, J.; YAO, Z.; YATES, J.; PREJEAN, M. V.; DELUMEAU, O.; NOIROT, P.; WEDLICH-SÖLDNER, R.; FILIPE, S. R.; CARBALLIDO-LÓPEZ, R. An early cytoplasmic step of peptidoglycan synthesis is associated to MreB in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 348–362, 2014.

SALJE, J.; VAN DEN ENT, F.; DE BOER, P.; LÖWE, J. Direct membrane binding by bacterial actin MreB. **Molecular Cell**, v. 43, n. 3, p. 478–487, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA). Resolução SAA nº 147, de 31 de outubro de 2013. Estabelece procedimentos a serem adotados no Estado de São Paulo visando a supressão/erradicação da praga denominada cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 1º Nov. 2013. Seção 1. pág. 50.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA). Resolução SAA nº 10, de 20 de fevereiro de 2017. Delimita e oficializa todo o território do Estado de São Paulo como área sob Sistema de Mitigação de Risco, relativo à praga do cancro cítrico, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e institui procedimentos fitossanitários. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, 21 Fev. 2017. Seção 1. pág. 20.

SAVIETTO, A.; POLAQUINI, C. R.; KOPACZ, M.; SCHEFFERS, D. J.; MARQUES, B. C.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H. Antibacterial activity of monoacetylated alkyl

gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 6, p. 929–937, 2018.

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.

SHI, H.; BRATTON, B. P.; GITAI, Z.; HUANG, K. C. How to build a bacterial cell: MreB as the foreman of *Escherichia coli* construction. **Cell**, v. 172, n. 6, p. 1294–1305, 2018.

SHIH, Y. L.; LE, T.; ROTHFIELD, L. Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 13, p. 7865–7870, 2003.

SRIVASTAVA, P.; DEMARRE, G.; KARPOVA, T. S.; MCNALLY, J.; CHATTORAJ, D. K. Changes in nucleoid morphology and origin localization upon inhibition or alteration of the actin homolog, MreB, of *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 20, p. 7450–7463, 2007.

SWARUP, S.; DE FEYTER, R.; BRLANSKY, R. H.; GABRIEL, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit cankerlike lesions on citrus. **Phytopathology**, v. 81, n. 7, p. 802–809, 1991.

SWARUP, S.; YANG, Y.; KINGSLEY, M. T.; GABRIEL, D. W. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, n. 3, p. 204–213, 1992.

SWULIUS, M. T.; CHEN, S.; JANE DING, H.; LI, Z.; BRIEGEL, A.; PILHOFER, M.; TOCHEVA, E. I.; LYBARGER, S. R.; JOHNSON, T. L.; SANDKVIST, M.; JENSEN, G. J. Long helical filaments are not seen encircling cells in electron cryotomograms of rod-shaped bacteria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 407, n. 4, p. 650–655, 2011.

SWULIUS, M. T.; JENSEN, G. J. The helical MreB cytoskeleton in *Escherichia coli* MC1000/pLE7 is an artifact of the N-terminal yellow fluorescent protein tag. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6382–6386, 2012.

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.

URSELL, T. S.; NGUYEN, J.; MONDS, R. D.; COLAVIN, A.; BILLINGS, G.; OUZOUNOV, N.; GITAI, Z.; SHAEVITZ, J. W.; HUANG, K. C. Rod-like bacterial shape is maintained by feedback between cell curvature and cytoskeletal localization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 11, p. E1025–E1034, 2014.

USDA; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Citrus: Word Markets and Trade**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>> Acesso em 10 de dezembro de 2018.

VAN TEEFFELEN, S.; WANG, S.; FURCHTGOTT, L.; HUANG, K. C.; WINGREEN, N. S.; SHAEVITZ, J. W.; GITAI, Z. The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 38, p. 15822–15827, 2011.

WACHI, M.; DOI, M.; TAMAKI, S.; PARK, W.; NAKAJIMA-IIJIMA, S.; MATSUHASHI, M. Mutant isolation and molecular cloning of mre genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 11, p. 4935–4940, 1987.

WHITE, C. L.; KITICH, A.; GOBER, J. W. Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 616–633, 2010.

WOLK, C. PETER; CAY, Y. Use of a conditionally lethal gene in *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to select for double recombinants and to entrap insertion sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3138–3145, 1990.

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

APÊNDICE A – PRIMERS

Quadro 2 – Primers utilizados, com suas respectivas sequências e produtos de PCR.

Primers	Sequências e sítios de restrição	Produto de PCR
mreBF-comp	<i>Xho</i> 5'- AAAA CTCGAG ATGTTCAAGAACTCCGCGG	Gene <i>mreB</i> ; componente do vetor de complementação.
mreBR-comp	<i>Xba</i> 5'- TTTT TCTAGA TCACTCCGGCGCGAAGAACTC	
mreBupF	<i>HindIII</i> 5'- AAAA AAGCTT CTCGTAGTCGTTGACCACCAC	Fragmento <i>upstream</i> ; componente do vetor de deleção.
mreBupR	<i>KpnI</i> 5'- TT GGTACC GAGGGAGTCGTTCTGGGTAAG	
mreBdownF	<i>KpnI</i> 5'- AA GGTACC AGCGCTCGGAATCGGGAATC	Fragmento <i>downstream</i> ; componente do vetor de deleção.
mreBdownR	<i>EcoRI</i> 5'- TTT GAATTC ACTGCGTGGTCGGGGTCGGTG	
mreBupF	<i>HindIII</i> 5'- AAAA AAGCTT CTCGTAGTCGTTGACCACCAC	Regiões <i>upstream</i>, <i>downstream</i> e <i>mreB</i> (se houver) ; utilizados para confirmar a deleção de <i>mreB</i> .
mreBdownR	<i>EcoRI</i> 5'- TTT GAATTC ACTGCGTGGTCGGGGTCGGTG	
mreB-f1F	<i>Xho</i> 5'- AAA CTCGAG ATGTTCAAGAACTCCGCGG	Fragmento 1 do gene <i>mreB</i> ; componente da fusão em sanduíche com <i>gfp</i> .
mreB-f1R	<i>HindIII</i> 5'- TTT AAGCTT GGCGCAGCCGATCTGCAGCTTG	
Gfp-mreBF	<i>HindIII</i> 5'- AAAA AAGCTT ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTC	Gene <i>gfp</i> ; componente da fusão em sanduíche com <i>mreB</i> .
Gfp-mreBR	<i>PstI</i> 5'- TTTT CTGCAG TGCTTCTTTGTATAGTTCATC	
mreB-f2F	<i>PstI</i> 5'- AAA CTGCAG TACCCGCAGGACGAGGTGCAG	Fragmento 2 do gene <i>mreB</i> ; componente da fusão em sanduíche com <i>mreB</i> .
mreB-f2R	<i>Xba</i> 5'- TTT TCTAGA TCACTCCGGCGCGAAGAACTC	
201410GmF	<i>BamHI</i> 5'- AA GGATCC AGGAGGTCAATATCCATGTTACG CAGCAGCAACGATG	Gene que confere resistência à gentamicina, componente do vetor de complementação.
201409GmR	5' - AATTAGGTGGCGGTACTTGGGTG	

APÊNDICE B – LINHAGENS

Quadro 3 – Linhagens utilizadas, com suas respectivas características e referências.

Linhagem	Principais características	Referência
<i>X. citri</i>	Linhagem 306 de <i>Xanthomonas citri</i> subsp <i>citri</i> ; Ap ^R	IBSBF-1594* (Schaad et al., 2006).
<i>X. citri amy::pCMP2</i>	Expressa <i>mreB</i> em <i>amy</i> ; Ap ^R ; Gm ^R	Este trabalho.
<i>X. citri ΔmreB amy::pCMP2</i>	Possui deleção entre as coordenadas genômicas 776860-777906; Ap ^R ; Gm ^R	Este trabalho.
<i>X. citri amy::pCMP4</i>	Expressa a fusão em sanduíche de <i>mreB-gfp</i> ; Km ^R ; Ap ^R ;	Este trabalho.
<i>E. coli</i> DH10B	Linhagem utilizada para clonagem	Invitrogen

*Instituto Biológico, Seção de Bacteriologia Fitopatológica, Campinas, SP, Brasil;