

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 15/08/2021.

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

**Localização subcelular de proteínas de *Xanthomonas citri*
subsp. *citri* utilizando proteína repórter**

Michelle Mendonça Pena

Bióloga

2019

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

**Localização subcelular de proteínas de *Xanthomonas citri*
subsp. *citri* utilizando proteína repórter**

Michelle Mendonça Pena

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária

Pena, Michelle Mendonça
P3971 Localização subcelular de proteínas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*
utilizando proteína repórter / Michelle Mendonça Pena. – – Jaboticabal, 2019
86 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Maria Inês Tiraboschi Ferro
Coorientador: Jesus Aparecido Ferro

1. Microscopia de Fluorescência. 2. Localização subcelular de proteínas. 3.
Genética de Bactérias. 4. Interação Planta-Patógeno. 5. Cancro cítrico. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pela
autora.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE PROTEÍNAS DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* UTILIZANDO PROTEÍNA REPÓRTER

AUTORA: MICHELLE MENDONÇA PENA


ORIENTADORA: MARIA INES TIRABOSCHI FERRO

COORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:


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


Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IBILCE / UNESP - Rio Claro


Pesquisador Dr. ALESSANDRO DE MELLO VARANI
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


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


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

Jaboticabal, 15 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MICHELLE MENDONÇA PENA, nascida em 16 de maio de 1986 na cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais. Filha de José Carlos de Araújo Pena e Maria Inês Luiz de Mendonça. Em 2005 iniciou o curso de Ciências Biológicas pelo Centro Universitário do Cerrado – Patrocínio (UNICERP), em Patrocínio, Minas Gerais, obtendo o título de Bióloga em 2008. Em março de 2013 ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, em Jaboticabal, São Paulo. Recebeu auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), desenvolvendo pesquisas voltadas para identificação de genes candidatos a Barcode em plantas carnívoras, sob a orientação do Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda e coorientação do Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani. Obteve o título de mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) em julho de 2015. Em agosto do mesmo ano, ingressou no curso de doutorado pelo Programa Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, também da FCAV/UNESP, com auxílio financeiro da CAPES, sob orientação da Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro e coorientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro.

Em 2018, foi contemplada com uma bolsa de Doutorado Sanduíche no Exterior, através do Programas Estratégicos (PE) da CAPES, para realizar estágio no Laboratório de Patologia e Bacteriologia de Citros, do Professor Nian Wang, no Citrus Research and Education Center (CREC), da Universidade da Flórida, em Lake Alfred, Flórida, Estados Unidos. Até o presente momento, a autora dedicou sua pesquisa acadêmica às áreas de Biologia Molecular, Genética de Bactérias, Fitopatologia e Biotecnologia voltada para estudos de plantas e microrganismos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela vida maravilhosa que me foi concedida por Deus e pela oportunidade de aprendizado e evolução nesse plano terrestre. Cada momento que vivi durante todo o período de pós-graduação foi importante para meu crescimento pessoal e me ajudou a entender quais são meus objetivos na vida.

A todos da minha família, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que eu pudesse finalizar mais uma etapa da minha formação. Por entenderem que para encontrar meu caminho eu precisei ficar longe de vocês e por sempre me acolherem quando precisei de colo.

To my boyfriend Gant, you are an inspiration and an example of persistence, dedication and hard work. Thank you for always being there for me, for having the best words, advices and for supporting me through difficult times.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro e Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro por acreditarem na minha capacidade e por me permitirem desenvolver meu trabalho da melhor maneira possível, sem medir esforços. Obrigada por sempre estarem disponíveis quando eu precisei, por entenderem quando passei por momentos difíceis e por lutarem comigo. Com vocês aprendi lições que mudaram minha vida profissional e pessoal.

Ao prof. Dr. Henrique Ferreira, por todo apoio, atenção, e disponibilidade em me ajudar, responder dúvidas, por sempre abrir as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar parte da minha pesquisa. Aos alunos do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB) pela ajuda com os experimentos em Rio Claro.

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

Aos professores e funcionários da FCAV, em especial aos que trabalham no Departamento de Tecnologia e Seção Técnica de pós-graduação.

À Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do doutorado e Ao Conselho do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária do qual fiz parte por dois anos.

Aos membros do LBM e CREBIO por todo apoio e ajuda durante a realização dos experimentos e por toda experiência compartilhada ao longo desses 4 anos.

To Dr. Nian Wang, from University of Florida, for opening his laboratory and allowing me to do a great work. It was a great opportunity for me and I'm thankful for that.

To my friends/co-workers from CREC and Wang's lab, you guys have made my time there amazing and I will remember this experience forever.

Aos amigos que fiz em Jaboticabal e Rio Claro, que foram minha segunda família, meu alívio em momentos difíceis e que de diversas maneiras, todos contribuíram para que eu chegasse ao final dessa etapa.

Difícilmente uma pessoa vence uma batalha sozinha, eu com certeza tive o apoio de diversas pessoas ao longo do caminho, pessoas que se tornaram grandes amigos, pessoas com as quais aprendi grandes lições, pessoas que foram exemplos de solidariedade, compaixão e amor ao próximo. Espero um dia poder retribuir o que fizeram por mim...

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Citricultura: origem, importância econômica e contexto atual.....	4
2.2 Cancro cítrico: características e implicações na citricultura	6
2.3 Genoma de <i>X. citri</i> e proteínas sem função conhecida (hipotéticas).....	13
2.4 Uso de microscopia de fluorescência como ferramenta para localização subcelular de proteínas	17
3. REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 2 – mCherry fusions enable the subcellular localization and pattern differentiation of periplasmic and cytoplasmic proteins in <i>Xanthomonas</i> sp.....	30
Abstract.....	30
Introduction.....	31
Material and methods.....	32
Bacterial strains, plasmids and culture conditions	32
Details of plasmid construction and genes cloning	33
Fluorescence microscopy	35
Growth curve and pathogenicity assays	35
Western Blotting, Coomassie Blue and qRT-PCR.....	36
Results	37
The integrative mCherry vector for <i>X. citri</i>	37
Stable integration of pMAJIIc into <i>X. citri</i> chromosome	37
Subcellular localization of cytoplasmic and periplasmic proteins in <i>X. citri</i>	38

Integration into <i>X. citri</i> chromosome does not affect bacteria pathogenicity and viability..	41
Effect of arabinose on the expression of mCherry under control of <i>araBAD</i> promoter.....	43
Discussion	45
Acknowledgments	47
References	47
Supplementary material	52
CAPÍTULO 3 – Subcellular localization of EnvC homologue and its role in cell separation and virulence of <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	53
Abstract	53
Introduction.....	54
Material and methods	55
Bacterial strains, plasmids and culture condition	55
Mutant construction and complementation	56
Microscopy	57
Pathogenicity assay and bacterial strains viability	58
Protein Modeling	58
Results	59
<i>X. citri</i> encodes an EnvC-like protein that is conserved in many bacteria	59
Deletion of <i>envC</i> affects <i>X. citri</i> virulence	61
.....	62
Periplasmic protein EnvC is required for <i>X. citri</i> daughter cell separation.....	63
Discussion	66
Acknowledgments	68
References	68
Supplementary material	72

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE PROTEÍNAS DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* UTILIZANDO PROTEÍNA REPÓRTER

RESUMO – *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) é uma bactéria fitopatogênica, conhecida por causar Cancro Cítrico Asiático (CCA) na maioria das espécies economicamente importantes de citros. A bactéria possui em seu genoma inúmeros genes que codificam para proteínas sem função descrita. A elucidação da localização subcelular e da função dessas proteínas são uma importante estratégia para o entendimento dos mecanismos e vias envolvidos na interação planta-patógeno. Assim, um vetor integrativo (pMAJIIc) contendo a proteína vermelha fluorescente mCherry foi construído com o objetivo de possibilitar a expressão e localização intracelular de proteínas de *X. citri* fusionadas a mCherry. O vetor pMAJIIc se integra no gene da α -amilase de *X. citri*, mas a interrupção do gene α -amilase não afetou a patogenicidade e a virulência da bactéria e a integração do vetor ao cromossomo bacteriano se manteve estável ao longo de diversas gerações. Com este vetor foi possível demonstrar em *X. citri* um padrão de emissão de fluorescência para proteínas citoplasmáticas e periplasmáticas. A proteína VrpA fusionada a mCherry foi visualizada circundando a membrana externa bacteriana, enquanto a proteína GyrB fusionada a mCherry foi visualizada difusa pelo citoplasma, com alguns pontos de acumulação localizados próximos aos polos da célula. O vetor também foi utilizado para a caracterização e localização subcelular da proteína hipotética XAC0024 de *X. citri*, agora anotada como EnvC. O mutante para o gene *envC* ($\Delta envC$) apresentou virulência reduzida e atraso no desenvolvimento das lesões típicas de cancro cítrico quando inoculado em folhas de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). Além disso, o mutante $\Delta envC$ apresentou células morfologicamente alteradas, com formato filamentososo e formação de minicélulas, indicando que essa proteína é um dos fatores responsáveis pela correta separação de células filhas bacterianas. A localização subcelular da proteína EnvC fusionada a mCherry apresentou o padrão descrito para proteínas periplasmáticas, sendo visualizada circundando a membrana externa bacteriana. Assim, pela primeira vez demonstramos que fusões com mCherry para localização subcelular de proteínas em *X. citri* utilizando vetor integrativo permite a identificação de um padrão de emissão de fluorescência específico para proteínas citoplasmáticas e periplasmáticas, o que tornou possível a caracterização de uma proteína até então sem função conhecida em *X. citri*.

Palavras-chave: mCherry, *vrpA*, *gyrB*, *envC*, microscopia de fluorescência, virulência

PROTEIN SUBCELLULAR LOCALIZATION of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* USING REPORTER PROTEIN

ABSTRACT – *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) is a phytopathogenic bacterium well known for causing Asiatic Citrus Canker (CCA) in the most economically important citrus species. The bacterium has in its genome several genes that code for proteins with no described function. The elucidation of the subcellular localization and function of these proteins is an important strategy for understanding the mechanisms and pathways involved in plant-pathogen interaction. Thus, an integrative vector (pMAJIIc) containing the red fluorescent protein mCherry was constructed to enable the expression and intracellular localization of mCherry fused proteins in *X. citri*. The pMAJIIc vector integrates into *X. citri*'s α -amylase gene, but disruption of the α -amylase gene did not affect the pathogenicity and virulence of the bacterium, and the integration of the vector into the bacterial chromosome remained stable over several generations. Using this vector, it was possible to demonstrate a fluorescence emission pattern for cytoplasmic and periplasmic proteins in *X. citri*. The mCherry fused VrpA protein was visualized surrounding the bacterial outer membrane, while the mCherry fused GyrB protein was visualized diffused by the cytoplasm, with some accumulation points located near the cell poles. The vector was also used for the characterization and subcellular localization of *X. citri*'s hypothetical protein XAC0024, now named EnvC. The mutant for *envC* gene ($\Delta envC$) showed reduced virulence and delayed development of the typical lesions of citrus canker when inoculated in leaves of Rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck). In addition, the $\Delta envC$ mutant showed morphologically altered cells with filamentous shape and formation of minicells, indicating that this protein is one of the factors responsible for the correct separation of bacterial daughter cells. The subcellular localization of the mCherry-fused EnvC protein showed the pattern described for periplasmic proteins, being visualized surrounding the bacterial outer membrane. Thus, for the first time we demonstrated that the mCherry fusions for subcellular localization of protein in *X. citri* using the integrative vector allows the identification of a specific fluorescence emission pattern for cytoplasmic and periplasmic proteins, which allowed the characterization of a protein with no known function in *X. citri*.

Keywords: mCherry, *vrpA*, *gyrB*, *envC*, fluorescence microscopy, virulence

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, assim como *Fortunella* e *Poncirus*, e é originário das regiões tropicais e subtropicais do continente asiático e do arquipélago malaio (ALVES; MELO, 2003). No Brasil, os citros foram introduzidos durante o período de colonização, expandindo-se então por todo o território nacional e ganhando destaque em produção por meados de 1980, com o desenvolvimento industrial do país (NEVES et al., 2010).

A produção brasileira de citros é voltada principalmente para o cultivo de laranjas doces e destina-se principalmente ao processamento industrial para o preparo de suco de laranja concentrado e congelado (“Frozen Concentrated Orange Juice” - FCOJ). O país é o maior produtor mundial de laranja, e a estimativa de produção para a safra 2018/2019 é de 17,7 milhões de toneladas (USDA, 2019), sendo São Paulo o Estado com maior produção, responsável por 62,69% (10,97 milhões de toneladas) desse montante (FUNDECITRUS, 2019).

Dentre os diversos problemas fitossanitários que acometem a citricultura brasileira, o cancro cítrico é uma das doenças mais devastadoras (BELASQUE JÚNIOR et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2008), pois acomete a maioria das espécies e cultivares comercialmente importantes e reduz diretamente a qualidade do fruto. São conhecidos diversos tipos de cancro cítrico, causados por diferentes agentes patogênicos, os quais apresentam diferenças em sua patogenicidade e sintomatologia (ROSA, 2010). O cancro cítrico asiático ou cancrose A, é o tipo economicamente mais importante da doença (GOTTWALD et al., 2002), e é causado pela estirpe A da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*).

A *X. citri* é uma bactéria Gram-negativa, estritamente aeróbica, dotada de um único flagelo polar e que apresenta células do tipo bastonete (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). Essa bactéria está adaptada ao ambiente das plantas cítricas, com crescimento endofítico, sendo raramente encontrada livre no solo (WELLS, 1987; SWINGS; CIVEROLO, 1993). A disseminação da doença é feita de forma direta e a bactéria pode chegar a um pomar por meio da chuva com vento (aerossol), do material de colheita, do trânsito de pessoas, veículos e máquinas agrícolas, de mudas

contaminadas, além de poder disseminar-se por contaminação nos frutos, no ar, no solo e pela presença de insetos (PALAZZO et al., 1984; BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

No cancro cítrico, como em muitas outras doenças bacterianas, o patógeno entra nos tecidos da planta hospedeira através dos estômatos ou feridas e os sintomas podem aparecer nas folhas, frutos e ramos como lesões circulares, corticosas e eruptivas, de coloração marrom, circundadas por um halo amarelo (MOREIRA et al., 2004). O gênero *Citrus* apresenta uma ampla variação nos níveis de tolerância ao cancro cítrico, porém não existem variedades ou espécies de uso comercial que sejam completamente resistentes à doença (FUNDECITROS, 2019).

As estratégias de combate empregadas até o momento não são eficazes e o método mais seguro de erradicar a doença dos pomares é por meio da eliminação das plantas contaminadas, processo que traz significativas perdas econômicas (SCHUBERT et al. 2001). Outro método utilizado é borrifar as plantas com caldas de cobre metálico, o que pode levar ao surgimento de cepas resistentes e à contaminação do ambiente. Assim, diversos estudos relacionados ao agente etiológico do cancro cítrico têm sido desenvolvidos com vistas à obtenção de estratégias menos onerosas e que causem menos danos ao meio ambiente.

Com a publicação do genoma completo da *X. citri* estirpe 306 (DA SILVA et al., 2002), a utilização de abordagens de genômica funcional no estudo dos genes envolvidos na patogenicidade e virulência desta bactéria têm proporcionado grandes avanços para o entendimento do patossistema citros - *X. citri*; porém, o arsenal utilizado pelo patógeno na colonização e ataque ao hospedeiro ainda não foi totalmente caracterizado e compreendido em suas particularidades individuais e inter-relacionais (JALAN et al., 2014). Desta forma, o conhecimento da biologia, dos mecanismos moleculares a níveis fisiológico, bioquímico, e também com relação às proteínas é crucial para o entendimento das interações planta-patógeno e desenvolvimento de novos métodos para o controle do cancro cítrico (WOOD, 1987; PASCHOLATI, 2008).

Dentre os genes abordados no presente trabalho, o gene XAC0024 codifica para uma proteína hipotética que apresenta no N-terminal um peptídeo sinal composto por 20 aminoácidos, como predito pelo programa *SignalP 4.1 Server* (PETERSEN et al., 2011), e possui também um domínio catalítico peptidase M23, domínio este que

abrange uma superfamília de proteínas responsáveis pelo processo de proteólise, além de outros domínios relacionados com a divisão celular.

O mutante do gene XAC0024 (Δ XAC0024), quando inoculado em folhas de Limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), apresentou diminuição das lesões típicas de cancro cítrico quando comparadas com as lesões causadas pela estirpe selvagem (MARTINS, 2016). No entanto ainda não se sabe a função e local de atuação da proteína codificada por esse gene, sendo sua elucidação de grande importância para a compreensão dos mecanismos moleculares de virulência da bactéria, podendo possivelmente contribuir para a elaboração de novas estratégias de erradicação do cancro cítrico.

Embora existam inúmeras maneiras de se caracterizar a função de genes e proteínas, novas ferramentas precisam ser desenvolvidas e aprimoradas para tornar essa caracterização mais eficaz. A função de proteínas pode ser elucidada em parte pela fusão com proteínas fluorescentes e pela determinação de seu sinal de marcação e acumulação subcelular (GOODIN et al., 2002).

mCherry é uma proteína que apresenta fluorescência vermelha, possuindo um comprimento de onda de excitação/emissão de 587/610nm, respectivamente. Essa proteína é um homólogo derivado de DsRed (“red fluorescent protein”), originalmente isolado de um cnidário, e tem sido amplamente aplicada em fusões para localização de proteínas em procariotos e eucariotos (RAMSON et al., 2015; DUELLMAN et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Com base em suas características físico-químicas e principalmente pelo fato dessa proteína ser funcional no ambiente oxidativo do periplasma de bactérias, mCherry possibilita a localização subcelular de proteínas.

Dentro deste contexto, o nosso trabalho de Tese teve como objetivos: 1) a construção de um vetor de expressão contendo a proteína repórter mCherry, que fosse capaz de revelar a localização subcelular de proteínas em *X. citri* a ela fusionadas e que não causasse nenhuma alteração do fenótipo da estirpe selvagem e 2) utilização deste vetor para a caracterização da proteína codificada pelo gene XAC0024 de *X. citri*, anotada como proteína hipotética, ou seja, sem função conhecida.

Discussion

Gram-negative bacteria possess a tight peptidoglycan layer localized in its periplasmic space, between the outer and inner membranes (VOLLMER et al., 2008). This polymer is composed of glycan strands of β -1,4-glycosidic bond-linked N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid disaccharide cross-linked by short peptides and plays an essential role in preservation and maintenance of cell shape and integrity (SILHAVY et al., 2010). Two main classes of peptidoglycan-lytic enzymes are responsible for assembly the peptidoglycan: the glycosidases that cleave the glycan backbone and the amidases (or peptidases) that cleave the peptide sidechain (FRIRDICH; GAYNOR, 2013).

The *Xanthomonas citri*'s EnvC protein has a predicted M23 peptidase domain, which is part of a metallopeptidase's superfamily characterized by the presence of zinc in its active enzyme site (WU et al., 1990). Included in this enzyme's family is the NlpD from *E. coli*, a LytM factor that is responsible, as well as EnvC, for activate the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases (AmiA, AmiB and AmiC). Those enzymes are necessary for daughter cell separation and inactivation of the genes encoding by them results in long cell chains formation (HEIDRICH et al., 2001; UEHARA et al., 2009; UEHARA et al., 2010).

Here we showed that *envC* mutant of *Xanthomonas citri* strain displayed a defect in cell separation allied with differences in cell morphology. Bacteria cultures of $\Delta envC$ exhibited elongated rods, filaments and minicells. Similar results were observed by Yang and coworkers (2018) in *Xanthomonas campestris* strains lacking NlpD, EnvC or AmiC1 which showed a severe defect in daughter cell separation. However, the physiological roles of peptidoglycan hydrolases factors are still unclear, since the loss of an individual enzyme has little effect on growth and division, suggesting that there is significant functional overlap between the innumerable hydrolases (VOLLMER et al., 2008).

Despite of this information, a collection of *E. coli* mutants lacking individual LytM factors (EnvC, NlpD, YgeR and YebA) and all possible combination of them was generated by Uehara and coworkers (2009), and only the mutants with *envC* deletion

failed to separate normally, confirming that EnvC plays a critical role for proper cell separation in this bacteria.

Xanthomonas citri mutant lacking EnvC showed a delay in citrus canker symptomatology compared with the wild-type and complemented strains. The bacteria's virulence was affected by the gene inactivation which could be demonstrated by the inoculation of mutant strain into citrus plant and observation of the disease development. The $\Delta envC$ (pMAJIIc-*envC*) complemented strain restored the virulence comparable with those of the wild-type, demonstrating that was not a polar mutation effect. Interestingly, *Xanthomonas campestris* strains lacking either NlpD or AmiC1 almost completely lost virulence, but the mutant lacking EnvC showed levels of virulence like the wild-type strain (YANG et al., 2018).

According to the amino acid sequence analysis performed by SignalP 5.0 server (ARMENTEROS et al., 2019), EnvC from *Xanthomonas citri* has a signal peptide and its cleavage site is between the amino acids position 20 and 21 (Figure S2 A). The same analysis was performed for *E. coli*'s and *Xanthomonas campestris*' EnvC and its sequences also presented a signal peptide with a cleavage site between the amino acids 42 and 43 for *E. coli* and between the amino acids 14 and 15 for *Xanthomonas campestris* (Figure S2 B and C). The signal peptide serves as a membrane anchor and for many pathogenic bacteria, proteins that carry a signal peptide are intended to be transported to the periplasm by the type II or III secretion system (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; JHA; RAJESHWARI; SONTI, 2005; BUTTNER; ULLA BONAS, 2010; SOARES et al., 2010; RYAN et al., 2011; YAN; WANG, 2011; ZIMARO et al., 2014; ZHOU et al., 2015).

The fluorescence microscopy of EnvC-mCherry fusion in *Xanthomonas citri* displayed a signal pattern observed for periplasmic protein localization (PENA et al., 2019). The red fluorescent emission was clearly localized surrounding the outer membrane of the bacteria, while the cytoplasm remained non-fluorescent. The same pattern was successfully demonstrated for EnvC-mCherry fusion in *E. coli* (UEHARA et al., 2009), reinforcing the efficiency of this red fluorescent protein for periplasmic subcellular localization once GFP (green fluorescent protein) is not fluorescent when secreted to the periplasm in an unfolded conformation via Sec system (FEILMEIER et al., 2000).

Taken together, these results, as well as similar results from many other bacterial system studies, support the notion that EnvC appears to be recruited to the division site during cell division (BERNHARDT; BOER, 2003; BERNHARDT; BOER, 2004; UEHARA et al., 2009). The subcellular localization of EnvC in *Xanthomonas citri* has not been previously reported, and we confirm by the mCherry fusion that it is a periplasmic protein. However, the precisely actuation of EnvC and how this protein interacts with the other hydrolases in daughter cell separation is still unclear. Further studies of septal peptidoglycan splitting in *Xanthomonas* could provide us with more information about the peptidoglycan hydrolases regulation and its lysis mechanisms in bacteria division process.

Acknowledgments

This work is part of the Ph.D. thesis of M. M. Pena and Master's dissertation of T. Z. Martins and was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. We thank Dr. Henrique Ferreira for the kindly assistance and support with the microscope, microplate device and helpful comments. The Citrus Research and Education Center for allowed to use their microscope facilities. We also thank Dr. Fernanda Nogales, Dr. Yosvani Acanda and Naiara Zancanari for the support with experimental assays and analyzes.

References

- ARMENTEROS, J. J. A.; TSIRIGOS, K. D.; SONDERBY, C. K.; PETERSON, T. N.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. V.; NIELSEN, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 420-423, 2019.
- BERNHARDT, T. G.; de BOER, P. A. The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p.1171–1182, 2003.
- BERNHARDT, T. G.; de BOER, P. A. Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. **Mol. Microbiol.**, v. 52, p.1255–1269, 2004.

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

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 34, p. 107-133, 2010.

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

DAS, A. K. Citrus Canker - A review. **J. Appl. Hortic.**, v. 5, p. 52-60, 2003.

DO AMARAL, A. M.; TOLEDO, C. P.; BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatol Bras**, v. 30, p. 292-294, 2005.

FEILMEIER, B. J.; ISEMINGER, G.; SCHROEDER, D.; WEBBER, H.; PHILLIPS, G. J. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 4068-4076, 2000.

FIRCZUK, M.; BOCHTLER, M. Folds and activities of peptidoglycan amidases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 31, p. 676-691, 2007.

FREIESLEBEN, U. V.; KREKLING, M. A.; HANSEN, F. G.; LOBNER-OLESEN, A. The eclipse period of *Escherichia coli*. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 6240-6248, 2000.

FRIRDICH, E.; GAYNOR, E. C. Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 16, p. 767-778, 2013.

HEIDRICH, C.; TEMPLIN, M. F.; URSINUS, A.; MERDANOVIC, M.; BERGER, J.; SCHWARZ, H.; de PEDRO, M. A.; HOLTJE, J. V. Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 41, p. 167-178, 2001.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids. Symp. Ser.** n. 41, p. 95 - 98, 1999.

HIGUCHI, C.; KRUMMEL, B.; SAIKI, R. K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 7351-7367, 1988.

HOLM, L.; LAAKSO, L. M. Dali server update. **Nucleic acids research**, v. 44, p. 351-355, 2016.

HUGUET, E.; HAHN, K.; WENGELNIK, K.; BONAS, U. hpaA mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. **Molecular Microbiology**, v. 29, p. 1379-1390, 1998.

JHA, G.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Bacterial Type Two Secretion System Secreted Proteins: Double-Edged Swords for Plant Pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 891-898, 2005.

KANIGA, K.; DELOR, I.; CORNELIS, G. R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. **Gene**, v. 109, p. 137-141, 1991.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, p. 1547-1549, 2018.

LACERDA, L. A.; CAVALCA, L. B.; MARTINS, P. M. M.; GOVONE, J. S.; BACCI, JR.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. T.; SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. F. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiol**, v.9, 2009.

MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S.; CHITSAZ, F.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, D.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research Advance Access**, v. 43, p. 222-226, 2015.

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, JR. 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 Microbiol. Lett**, v. 310, p. 76-83, 2010.

MIKAELIAN, I.; SERGEAN, A. Modification of the overlap extension method for extensive mutagenesis on the same template. In: Trower MK (ed) In vitro mutagenesis protocol, **Humana**, Totowa, NJ, v. 57, p. 193-202, 1996.

MORÃO, L. G.; POLAQUINI, C. R.; KOPACZ, M.; TORREZAN, G. S.; AYUSSO, G. M.; DILARRI, G.; CAVALCA, L. B.; ZIELINSKA, A.; SCHEFFERS, D-J.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, H. A simplified curcumin targets the membrane of *Bacillus subtilis*. **MicrobiologyOpen**, e683, p. 1-12, 2018.

PENA, M. M.; FERREIRA, H.; TEPER, D.; WANG, N. FERRO, M. I. T.; SATO, K. U.; FERRO, J. A. mCherry fusions enable the subcellular localization and pattern differentiation of periplasmic and cytoplasmic proteins in *Xanthomonas* sp. **In preparation**, 2019.

RYAN, R. P.; VORHÖLTER, F. J.; POTNIS, N.; JONES, J. B.; SLUYS, M-A. V.; BOGDANOVE, A. J.; DOW, J. M. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 344-355, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, p. 406 - 425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 2, a000414, 2010.

SOARES, M. R.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, R. M.; MOREIRA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; MENECHINI, R.; GOZZO, F. C. Proteome of the phytopathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: a global expression profile. **BioMed Proteome Science**, v. 8, 2010.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673 - 4680, 1994.

UEHARA, T.; DINH, T.; BERNHARDT, T. G. LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 5094-5107, 2009.

UEGARA, T.; PARZYCH, K. R.; DINH, T.; BERNHARDT, T. G. Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. **EMBO J.**, v. 29, p. 1412-1422, 2010.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; de PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 32, p. 149-167, 2008.

WU, Q.; LAHTI, J. M.; AIR, G. M.; BURROWS, P. D.; COOPER, M. D. Molecular cloning of the murine BP-1/6C3 antigen: a member of the zinc-dependent metallopeptidase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 993-997, 1990.

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

YANG, L. C., GAN, Y. L.; YANG, L. Y.; JIANG, B. L.; TANG, J. L. Peptidoglycan hydrolysis mediated by the amidase AmiC and its LytM activator NlpD is critical for cell separation and virulence in the phytopathogen *Xanthomonas campestris*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 1705-1718, 2018.

ZHOU, X.; HU, X.; LI, J.; WANG, N. A Novel Periplasmic Protein, VrpA, Contributes to Efficient Protein Secretion by the Type III Secretion System in *Xanthomonas* spp. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, p. 143-153, 2015.

ZIMARO, T.; THOMAS, L.; MARONDEDZE, C.; SGRO, G. G.; GAROFALO, C. G.; FICARRA, F. A.; GEHRING, C.; OTTADO, J.; GOTTIG, N. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 14, 2014.

Supplementary material

Table S1: Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence
A(F)	CAGAGCCAGCGCGAGACCGAG
B(R)	ACGGTGGTGCAGCGGTGCATTGCGGCCAC
C(F)	GCACCGCTGCACCACCGTGACTGCAGTGGC
D(R)	TCAGCGGCGTTGCAGCCAGCT
0024_500_IF_F	AGATCCATGGCACTCGAGCGCCACTGATCTGGC
0024_500_IF_R	GCTCACCATCTCGAGGTCGTCGATCGGCGCGATCA
0024_IF_F	AGATCCATGGCACTCGAGATGTGGCTGGCGGTG
0024_IF_R	GCTCACCATCTCGAGGCGGCGTTGCAGCCAGCTCGA

Figure S1: Protein sequence alignment between: A: *XAC0024* from *Xanthomonas citri* and its homologue *XCC0022* from *Xanthomonas campestris*; B: *XAC0024* from *Xanthomonas citri* and EnvC from *Escherichia coli*. The alignments were performed using the NCBI - BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

A NP_635417.1 hypothetical protein XCC0022 [*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* str. ATCC 33913]
Sequence ID: Query_144521 Length: 405 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 405		Graphics		Next Match		Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
610 bits(1574)	0.0	Compositional matrix adjust.	359/405(89%)	378/405(93%)	0/405(0%)		
Query	7	VLACTLLGSMGASAQSQRETERKLLQQLRDELKTI	SADRRELEGKRGTA	AAQQLRQADEKVA	66		
Sbjct	1	+ ACTLL A AQSQR ERKLQQLRDELKTI	SADRR+LEGKRGTA	AAQQLRQADEKVA	60		
Query	67	KTARALSETEAAMRAEQHLSTLQQERAQLQRGLQNRQA	LAAALLRAADQVGRNAPL	KVL	126		
Sbjct	61	KTARALSETE A+R EQ LS LQ+RAQLQRGL+ QR	QLAALLRAAD VGRNAPL	KVL	120		
Query	127	LSQDTVGDATRMLADHRYVQNAQAQRIHALTTQLDALAT	VEQDIATRRQALDAARAQQKA	186			
Sbjct	121	LSQDTVGNATRMLADHRYVQNAQAQRIQGLTTQLEAL	TQVEQQTERRQALDAARAQQKA	180			
Query	187	QAATLQKDRSQQAATVAQLDDRYKQRAEREKAIGQDAKALE	QLLANLRAAAKAEAEERRA	246			
Sbjct	181	QAATLQKDRSQQAATVAQLDTRYQRAEREKALGQDAKALE	QLLANLRAAAKAEAEERRA	240			
Query	247	AARRAAAEAAAQAKRSKTERSDRPGKTPSKVVANAPAPK	VGGLSWPVAGNLLARFNATLP	306			
Sbjct	241	AA+RAAAEAAAQAKR KT+R +RPGKTP KVVANAPAPK	VGGLSWPV+GNLLARFNATLP	300			
Query	307	DGHTSKGVLIGAPKGTVTAVADGTVVFSWMTGYGMIL	IVDHGNGYMSLYAHNDTL	LRD	366		
Sbjct	301	DGHTSKGVLIGAPKGTVTAVADGTVVFSWMTGYGMIL	IVDHGNGYMSLYAHNDTL	LRD	360		
Query	367	AGATIKRGDAVAVKVGSSGGQVLPALYFELRRNGQVP	DPSWLQRR	411			
Sbjct	361	AGA+IKRG+AVAVKVGSSGGQVLPALYFELRRNGQVP	DPSWLQRR	405			

B WP_053884339.1 murein hydrolase activator EnvC [*Escherichia coli*]
Sequence ID: Query_171215 Length: 427 Number of Matches: 1

Range 1: 29 to 427		Graphics		Next Match		Previous Match	
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps		
196 bits(498)	9e-63	Compositional matrix adjust.	143/427(33%)	223/427(52%)	47/427(11%)		
Query	3	LAVGVLA	CTLLGSMGASAQSQRETERKLLQQLRDELKTI	SAD-----RRELEGKRGTA	55		
Sbjct	29	L+ GVL C SA + RD+LK+I AD R+ + +R +	LSAGVLLCAF-----SAHADE-----RDQLKSIQADIAAKERAVRQKQQQRASLL	73			
Query	56	QQLRQADEKVAKTARALSETEAAMRAEQHLSTLQQERAQL	QRGLQNRQA	LAAALLRAAD	115		
Sbjct	74	QL++ +E ++ R L ET+ + + + A+L++ Q LAA L AA	AQLKKQEEAISEATRKLRETQNTLNQLNKQIDEMNASIAKLEQQKAAQERSLAAQLDAAF	133			
Query	116	QVGRNAPLKVLLSQDTVGDATRMLADHRYVQNAQAQRIHAL	TTQLDALATVEQDIATRRQ	175			
Sbjct	134	+ G + +++LS + R+ A Y+ AR + I L +++A +R	RQGEHTGIQLILSGEESQRGRLQAYFGYLNQARQETIAQLKQ-----TREEVAMQRA	186			
Query	176	ALDAARAQQKAQAATLQKDRSQQAATVAQLDDRYKQRAEREKA	IGQDAKALEQLLAN---	232			
Sbjct	187	L+ +++Q+ L + R+QQA L++R K A E +I Q + L +L AN	ELEEKQSEQQT---LLEYQRAQQAKLTQALNERKKTLAGLESSIQGGQQQLSELRANESR	243			
Query	233	LRAAAKAEAEERRAAARRAAAEAAAQAKRSKTERSDRPGKT	--PSKVVANAPAPKVGGLS	290			
Sbjct	244	LR + A+AEA + A R A EA QA R + + + R G T P++ + + GGL	LRNSIARAEAAKVRAREAREA--QAVRDRQKEATRKGTTYKPTES-EKSLMSRTGGLG	300			
Query	291	-----WPVAGNLLARFNATLPDGHTSKGVLIGAPKGT	VTAVADGTVVFSWMTGYGM	343			
Sbjct	301	WPV G L R+ L KG++IGA +GT V A+ADG V+ +DW+ GYG+	APRQGAFWPVRGPTLHRYGEQLQGLRWKGMVIGASEGTEVKAIADGRVILADWLQGYGL	360			
Query	344	ILIVDHGNGYMSLYAHNDTLRDAGATIKRGDAVAVKVGSSGGQ	VLPALYFELRRNGQVPD	403			
Sbjct	361	+++V+HG G MSLY +N + L G+ ++ G +A VGSSGGQ P+LYFE+RR GQ V+	VVVVEHKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAGQPIALVGSSGGQGRPSLYFEIRRQGVAVN	420			
Query	404	PSSWLQRR	410				
Sbjct	421	P WL R PQPWLGR	427				

