
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LÚCIA BONCI CAVALCA

CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME,
MOTILIDADE E PATOGENICIDADE DE UMA
LINHAGEM MUTANTE DA BACTÉRIA

Xanthomonas citri* subsp. *citri

Rio Claro
2016

LÚCIA BONCI CAVALCA

CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME, MOTILIDADE E
PATOGENICIDADE DE UMA LINHAGEM MUTANTE DA BACTÉRIA
Xanthomonas citri subsp. *citri*

Orientador: Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de
Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela
em Ciências Biológicas

Rio Claro
2016

589.9 Cavalca, Lúcia Bonci
C376c Capacidade de formação de biofilme, motilidade e
 patogenicidade de uma linhagem mutante da bactéria
 Xanthomonas citri subsp. *citri* / Lúcia Bonci Cavalca. - Rio
 Claro, 2016
 19 f. : il., figs., gráfs.

 Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
 biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
 Biotecnologia de Rio Claro
 Orientador: Henrique Ferreira

 1. Bacteriologia. 2. Gene *parB*. 3. Cancro cítrico. 4.
 Segregação cromossômica. 5. Promotor arabinose. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Henrique Ferreira, por me proporcionar a oportunidade de aprender tanto com este projeto, por ter me acolhido tão bem em sua equipe e pela confiança depositada em meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo financiamento do projeto 2013/50367-8.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira - IAC, pela doação das plantas utilizadas nos testes de patogenicidade.

À pesquisadora Simone Cristina Picchi, por compartilhar seus conhecimentos de maneira tão prática e bem-humorada, contribuindo imensamente com o desenvolvimento deste trabalho.

A todo o pessoal do Centro de Citricultura, em especial do Laboratório de Biotecnologia, por terem me recebido tão bem e contribuído com meu aprendizado durante o período de treinamento em que estive por lá.

À Msc, Lilian Amaral Lacerda, por todo o trabalho e empenho dedicados à construção das linhagens mutantes aqui utilizadas.

Aos amigos e amigas, que fizeram com que o retorno à graduação valesse a pena em dobro; em especial à Marina, que acompanhou os êxitos e frustrações ao longo de todo o caminho, me ajudando a manter o ânimo e o foco.

RESUMO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é o agente causador do cancro cítrico, uma das doenças que mais vem preocupando os citricultores no Brasil e em especial no Estado de São Paulo. O setor da citricultura ainda carece de estratégias eficientes de combate ao cancro cítrico, sendo que as práticas mitigadoras utilizadas atualmente não são capazes de interferir na fisiologia da bactéria, impedir ou mesmo reduzir sua patogenicidade. O estabelecimento e propagação do cancro cítrico na planta hospedeira estão diretamente relacionados com a adesão, motilidade e formação de biofilme da bactéria. Neste estudo, avaliamos a motilidade, a capacidade de formação de biofilme e a patogenicidade de duas linhagens mutantes para *parB* - gene responsável pela coordenação da segregação cromossômica e de plasmídios em bactérias -, a fim de verificar se as alterações eventualmente provocadas na segregação dos cromossomos em decorrência da depleção/excesso de ParB seriam capazes de suprimir a patogenicidade de Xac. Xac WT originou curvas de crescimento típicas de *Xanthomonas*, enquanto a presença de arabinose no meio provocou queda no crescimento dos mutantes Xac $\Delta parB/pLAC1$ e Xac $\Delta parB/pLAC2$. A adição de arabinose ao meio também levou a uma redução de cerca de 45% na motilidade dos mutantes quando comparados à linhagem selvagem. Os mutantes Xac $\Delta parB/pLAC1$ e Xac $\Delta parB/pLAC2$ foram ainda capazes de provocar sintomas típicos de cancro cítrico em plantas jovens de laranja doce, mesmo quando inibidos. Nossos resultados indicam que não há alteração no padrão de desenvolvimento das culturas ou perda de patogenicidade em decorrência da depleção de ParB. O excesso da proteína na célula, porém, afeta negativamente a motilidade e o desenvolvimento das culturas ao longo do tempo.

Palavras-chave: gene *parB*; cancro cítrico; segregação cromossômica; promotor arabinose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	05
1.1 <i>Xanthomonas</i> , citricultura e o cancro cítrico	05
1.2 <i>Xanthomonas</i> e o sistema de partição <i>parAB</i>	06
2 OBJETIVOS	07
2.1 Objetivo geral	07
2.2 Objetivos específicos	07
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	07
3.1 Linhagens bacterianas e cultivo	07
3.2 Plantas	08
3.3 Curvas de crescimento	08
3.4 Avaliação da motilidade	08
3.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilme em placa	09
3.6 Avaliação da patogenicidade em planta	09
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
4.1 A depleção de <i>ParB</i> não altera o comportamento populacional de <i>Xac</i>	10
4.2 O excesso de <i>ParB</i> reduz a motilidade em <i>Xac</i>	12
4.3 Avaliação da capacidade de formação de biofilme em placa	14
4.4 A depleção de <i>ParB</i> não leva à perda de patogenicidade de <i>Xac</i>	15
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
6 REFERÊNCIAS	17

1 Introdução

1.1 *Xanthomonas*, citricultura e o cancro cítrico

O Brasil se destaca como um dos maiores produtores mundiais de laranjas desde o início da década de 1980, quando ultrapassou a produção obtida pelos Estados Unidos e quando a cultura passou a ser a quinta mais produtiva do país (FAO, 2015). O país é atualmente responsável pela produção de cerca de 25% dos 70 milhões de toneladas de laranjas produzidas no mundo (FAO, 2015; IBGE, 2015), sendo a produção somente do estado de São Paulo equivalente a mais de 15% da produção mundial (representando mais de 70% da produção brasileira). Até o final da década de 90, havia uma tendência gradual e constante de crescimento da produção de laranjas no Brasil, que rompeu-se, porém, no início dos anos 2000 (com uma queda de cerca de 20% no ano de 2001) e, desde então, a produção vem sofrendo flutuações ano a ano (FAO, 2015; IBGE, 2015), em parte como decorrência da disseminação de doenças como o cancro cítrico, provocado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) (SCHAAD *et al.*, 2005; 2006).

Desde que foi diagnosticado pela primeira vez no Estado de São Paulo, em 1957, o cancro cítrico tem sido controlado com medidas para eliminação das plantas infectadas, outras plantas ao seu redor ou até mesmo de todo o pomar, dependendo do nível de incidência da doença (BELASQUE Jr *et al.*, 2009). A partir de 2013, porém, devido à alta incidência do cancro cítrico e das perdas provocadas pela eliminação das plantas acometidas, a legislação foi abrandada e o controle tem sido feito com pulverizações de solução cúprica e a eliminação somente da planta sintomática (SANCHES *et al.*, 2014), sendo que o mercado ainda não dispõe de medidas mais efetivas ou menos prejudiciais ao ambiente.

As bactérias do gênero *Xanthomonas* são bacilos Gram-negativos flagelados e móveis, envoltos por uma camada de goma xantana (lipopolissacarídeo extracelular - EPS), e capazes de produzir o pigmento xantomonadina (que confere a coloração amarela característica de suas colônias), são aeróbios obrigatórios e sua temperatura ótima de crescimento encontra-se em torno de 28°C (SWINGS *et al.*, 1993).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) (SCHAAD *et al.*, 2005; 2006) é o agente etiológico do cancro cítrico asiático, forma mais severa e disseminada da

doença que acomete plantas do gênero *Citrus* em diversas regiões do mundo, com maior ou menor severidade, provocando lesões cloróticas e necróticas nos ramos, folhas e frutos (GOTTWALD, 2002; DAS, 2003). Em decorrência da doença, os frutos perdem valor de mercado ou nem mesmo chegam a se desenvolver; a perda econômica é ainda maior se considerarmos os gastos com o controle da doença, que incluem a eliminação de plantas infectadas, aspersão de compostos químicos, limpeza de equipamentos e manejo especializado (BEHLAU *et al.*, 2007; BELASQUE Jr *et al.*, 2009; SANCHES *et al.*, 2014).

1.2 *Xanthomonas* e o sistema de segregação cromossômica bacteriana

O sistema de partição *parABS* (ou sistema homólogo a este) é encontrado em cerca de 70% das bactérias conhecidas e estudadas (LIVNY, 2007), incluindo *Xanthomonas*. Este sistema é responsável por coordenar a segregação cromossômica e de alguns plasmídeos durante a divisão celular: proteínas ParB ligam-se ao DNA no sítio *parS*, normalmente localizado próximo à origem de replicação das moléculas, e são guiadas por proteínas ParA (com atividade ATPásica estimulada por ParB) para os polos, assegurando assim que cromossomos e plasmídios duplicados sejam destinados de maneira equitativa às células-filhas (Badrinarayanan *et al.*, 2015).

A ausência de ParB leva ao aumento de células anucleadas e pode produzir morte celular em bactérias tais como *C. crescentus* e *M. tuberculosis* (MIERZEWSKA & BURDZY, 2012). A disrupção de *parB* (provocada pela deleção parcial do gene) é capaz de inibir a patogenicidade de Xac, como mostrado por Ucci *et al.* (2014) em experimentos de infiltração de células mutantes em folhas de *C. limonia* Osbeck, embora a inibição de sua expressão (executada com uso de glicose em promotor arabinose) não tenha levado aos mesmos resultados (LACERDA, 2015). Ainda assim, a alteração da expressão de *parB* provoca alterações celulares presumivelmente decorrentes de deficiência na segregação cromossômica, como o aumento no número de células anucleadas e aberrações celulares, aumento do tamanho celular médio e redução da taxa de crescimento celular (LACERDA, 2015).

A depleção ou disrupção de *parB* provoca a formação de células anucleadas e queda na taxa de crescimento também em *Corynebacterium glutamicum* (DONOVAN,

2010) e *Pseudomonas aeruginosa*, além de redução de motilidade em *P. aeruginosa* (BARTOSIK, 2009), o que nos leva a questionar se a motilidade em *Xac* também não seria afetada da mesma maneira.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar se a depleção ou o excesso da proteína ParB promoveriam perda da patogenicidade em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar se a depleção ou excesso de ParB provocam alterações no padrão de crescimento em cultivo das linhagens mutantes quando comparadas à selvagem;

Investigar se a depleção ou excesso de ParB levam à redução ou perda da motilidade nas linhagens mutantes;

Averiguar se a depleção ou excesso de ParB levam à perturbação da capacidade de formação de biofilme nas linhagens mutantes; e

Verificar se há perda da patogenicidade em função da deleção de *parB* nas linhagens mutantes.

3 Materiais e métodos

3.1 Linhagens bacterianas e cultivo

Foram utilizadas as seguintes linhagens da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*): a) *Xac* 306 (tipo selvagem) sequenciada por da Silva et al. (2002); b) mutante *Xac* $\Delta parB/pLAC1$; e c) mutante *Xac* $\Delta parB/pLAC2$. Ambos os mutantes foram construídos por Lacerda (2015), por meio de deleção de *parB* cromossômico e introdução de plasmídeo replicativo contendo *parB* controlado pelo promotor induzível por arabinose *para*, note ainda que, em *Xac* $\Delta parB/pLAC2$, a proteína ParB é expressa contendo o peptídeo TAP em sua porção C-terminal (ParB-TAP). Para o preparo dos

pré-inóculos, as linhagens de Xac foram incubadas em BOD a 29°C em meio NYG (nitrogen-yeast-glycerol: 5g/L peptona, 3g/L extrato de levedura, 20mL/L glicerol) com ou sem ágar (15g/L), acrescidos de glicose (2%) ou arabinose (0,05%) quando necessário.

3.2 Plantas

Os testes *in vivo* foram realizados em plantas jovens de laranja doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) doadas pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira (IAC). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, construída com recursos FAPESP (processo 2013/14013-7). Os testes de patogenicidade foram realizados entre fevereiro e março de 2016.

3.3 Curvas de crescimento

Para construção das curvas de crescimento, a DO₆₀₀ dos pré-inóculos foi ajustada para 0,1 e a concentração efetiva dos inóculos verificada por meio de contagem de UFC. Em placa *multiwell* de 24 poços, foram inoculados 1,5mL de inóculo em cada poço; a placa foi então incubada a 30°C sob agitação constante em leitor de microplacas Biotek Synergy H1, que registrou a DO₆₀₀ dos poços a cada 30min por um período de 15h. Passadas 3h de incubação, foram adicionados glicose (concentração final de 2%) ou arabinose (concentração final de 0,05%) aos inóculos que seriam avaliados em condição de repressão ou indução de *parB*, respectivamente.

3.4 Avaliação da motilidade

Para os testes de avaliação de motilidade, a DO₆₀₀ dos pré-inóculos foi ajustada para 0,3 e a concentração efetiva dos inóculos foi verificada por meio de contagem de UFC. Foram inoculadas uma gota de cada linhagem (3μL cada), equidistantes umas das outras, em placas com NYGB (5g/L peptona, 3g/L extrato de levedura, 20mL/L glicerol, 2,5g/L ágar), acrescido de glicose (2%) ou arabinose (0,05%) quando necessário. As placas foram incubadas em BOD a 29°C e observadas com 24h, 36h, 48h e 72h para verificação do halo de crescimento das colônias.

Os resultados dos testes de motilidade foram avaliados por meio de ANOVA de

uma ou duas vias seguida de teste Tukey.

3.5 Avaliação da capacidade de formação de biofilme em placa

Para os testes de avaliação da capacidade de formação de biofilme em placa, a DO_{600} dos pré-inóculos foi ajustada para 0,1 e a concentração efetiva dos inóculos foi verificada por meio de contagem de UFC. Em placas *multiwell* de 96 poços, foram inoculados, por poço, 20µL de cultivo em 180µL de meio mínimo pH6.7 (1g/L $(NH_4)_2SO_4$, 4,5g/L KH_2PO_4 , 13,125g/L K_2HPO_4 , 0,5g/L $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 0,123g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,15g/L casaminoácidos, 2mL/L glicerol), acrescido de arabinose (0,05%) quando necessário; cada coluna representou uma linhagem/tratamento, sendo que as posições ocupadas por cada uma delas foi sorteada em cada uma das réplicas. As placas foram então incubadas em BOD a 29°C por 72h. Após esse período, a DO_{595} de cada poço foi registrada e o conteúdo líquido da placa descartado; cada poço foi lavado com 200µL de água e em seguida foram adicionados 200µL de solução de corante cristal violeta (1%) para reagir por 30 minutos com o biofilme aderido à placa. Após esse período, o corante foi retirado e cada poço lavado três vezes com 250µL de água; as placas foram deixadas em repouso até que secassem naturalmente e então foram adicionados 200µL de solução de etanol (70%) para ressuspender o corante ligado ao biofilme nas placas.

Ao final, a DO_{595} de cada poço foi registrada novamente e os valores obtidos foram divididos pelos registros iniciais, resultando em um índice relativo para quantidade de biofilme. Os resultados dos testes de capacidade de formação de biofilme foram então avaliados por meio de ANOVA de duas vias seguida de teste Tukey.

3.6 Avaliação da patogenicidade em planta

Para os testes de avaliação de patogenicidade, o meio de cultivo dos pré-inóculos foi substituído a cada 6h ao longo de 24h a fim de garantir a inibição de *parB* pela glicose, nos tratamentos em que esta foi utilizada. Ao final deste período, o meio de cultivo foi substituído por solução salina (0,85%), a DO_{600} dos inóculos ajustada para 0,4 (concentração celular na ordem de 10^8 UFC/mL) (BELASQUE Jr & JESUS Jr, 2006) e a concentração efetiva dos inóculos verificada por meio de contagem de UFC; 20 mL de cada inóculo foram então aspergidos sobre ramos jovens (estágio de desenvolvimento vegetativo V4 a V5; FUNDECITRUS) de plantas de *C. sinensis*; o

controle negativo foi feito com aspersão de 20mL de solução salina (0,85%). As plantas foram mantidas em câmaras úmidas (sacos plásticos) por 24h a fim de manter o ambiente ideal para que ocorresse infecção por Xac.

Foi feito acompanhamento diário para verificação da manifestação de sintomas do cancro cítrico. Este foi um teste qualitativo, cujos resultados foram avaliados em relação à presença/ausência de patogenicidade.

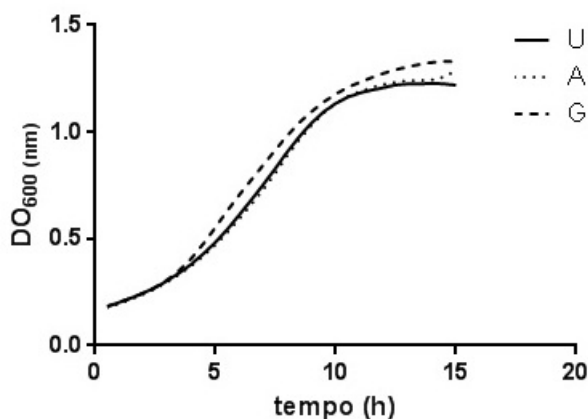
4 Resultados e discussão

4.1 A depleção de *ParB* não altera o comportamento populacional de Xac

A fim de comparar o comportamento das linhagens Xac WT, Xac $\Delta parB/pLAC1$ e Xac $\Delta parB/pLAC2$, acompanhamos seus perfis de crescimento populacional ao longo de 15 horas em meios com adição de arabinose (A), glicose (G) ou sem adição de açúcares (U).

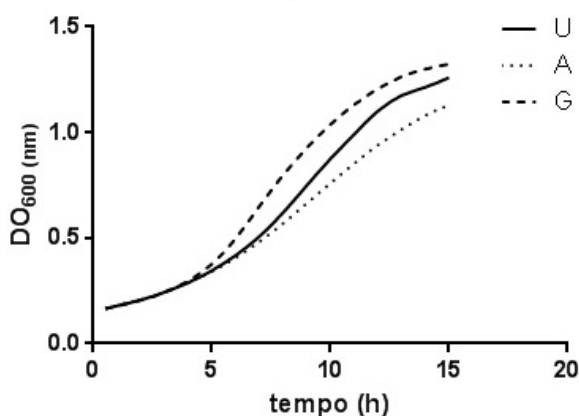
Podemos notar que as curvas de crescimento apresentadas pela linhagem Xac WT (Fig.1) correspondem a uma curva de crescimento típica de *Xanthomonas*: crescimento lento nas primeiras 4-5 horas (fase *lag*), seguido de crescimento exponencial (fase *log*) e estabilização da curva após cerca de 10 horas (fase estacionária). As curvas obtidas no tratamento controle e com arabinose foram idênticas (linhas contínua e pontilhada, respectivamente), enquanto houve ligeiro aumento na curva do tratamento com glicose (linha tracejada).

Figura 1 - Curvas de crescimento da linhagem Xac WT em meio com adição de arabinose (A), glicose (G) e controle (U).



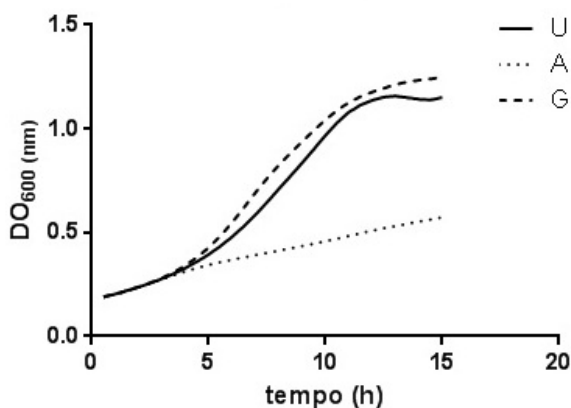
O desempenho da linhagem *Xac* $\Delta parB/pLAC1$ revelou crescimento ligeiramente mais lento que o de uma curva típica de *Xanthomonas*, com fases *lag* e *log* pouco mais longas, com duração de cerca de 5-6 horas cada. O crescimento foi elevado em presença de glicose (linha tracejada) e reduzido em presença de arabinose (linha pontilhada), como se observa na Figura 2:

Figura 2 - Curvas de crescimento da linhagem *Xac* $\Delta parB/pLAC1$ sob condições de indução (A), repressão (G) e controle (U).



Sob condição controle e em presença de glicose, a linhagem *Xac* $\Delta parB/pLAC2$ (Fig.3) também exibiu fases *lag* e *log* com duração de cerca de 5-6 horas, seguidas pela estabilização da curva. O crescimento foi maior em presença de glicose, enquanto a adição de arabinose impediu que sua população atingisse a fase de crescimento exponencial (linha pontilhada).

Figura 3 - Curvas de crescimento da linhagem *Xac* $\Delta parB/pLAC2$ sob condições de indução (A), repressão (G) e controle (U).



O aumento no crescimento das populações em presença de glicose observado nas curvas de crescimento se justifica pelo incremento nutricional proporcionado pela adição do açúcar ao meio de cultivo.

A duração mais longa das fases *lag* e *log* apresentada pelas linhagens *Xac ΔparB/pLAC1* e *Xac ΔparB/pLAC2* deve-se, possivelmente, ao tempo extra requerido para replicação do plasmídio inserido na célula e suas cópias.

As curvas de crescimento das linhagens *Xac ΔparB/pLAC1* e *Xac ΔparB/pLAC2*, quando comparadas à linhagem selvagem, sugerem que o efeito da depleção de ParB exerce pouca ou nenhuma influência sobre o desempenho de suas populações. O excesso da proteína, por outro lado, foi capaz de provocar efeito tóxico, o que explicaria a redução no crescimento de *Xac ΔparB/pLAC1* quando induzida por arabinose.

Além do possível efeito deletério causado pelo excesso de ParB, o comportamento apresentado por *Xac ΔparB/pLAC2* em condição de indução evidencia uma alta toxicidade devida à presença do peptídeo TAP na bactéria.

4.2 O excesso de *ParB* reduz a motilidade em *Xac*

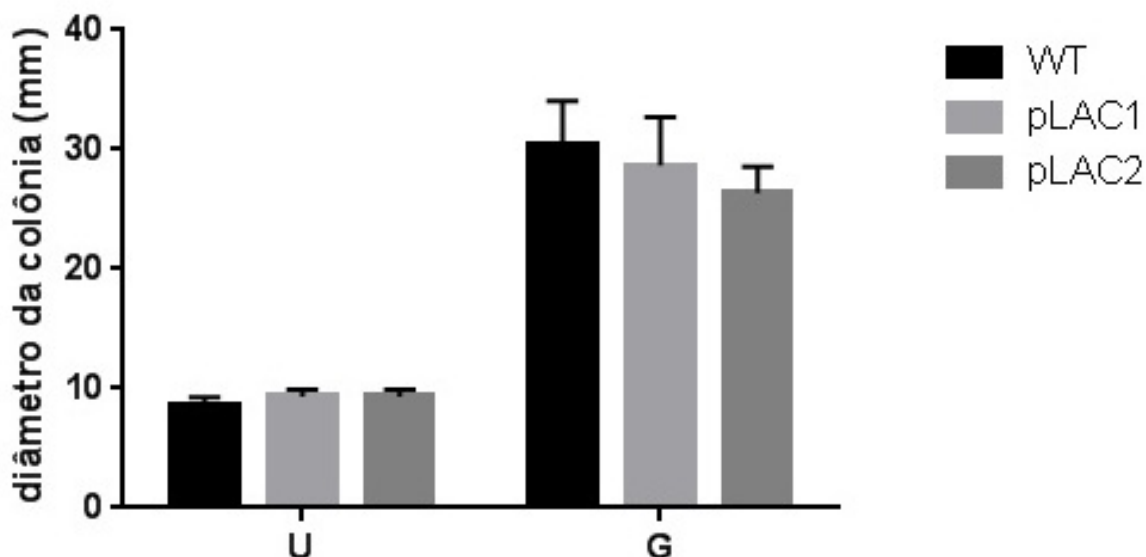
A influência da proteína ParB sobre a motilidade de *Xac* foi avaliada comparando-se a área dominada pelas colônias em meio NYGB, um meio de baixa concentração de ágar capaz de facilitar o movimento flagelar e consequentemente, a propagação da bactéria em sua superfície.

Sob condições controle e em presença de glicose, as três linhagens apresentaram médias de diâmetro das colônias semelhantes entre si. Com 36h de incubação, a média de diâmetro das colônias era próxima de 10mm na condição controle e cerca de 30mm em presença de glicose, tanto para *Xac WT*, quanto para os mutantes *Xac ΔparB/pLAC1* e *Xac ΔparB/pLAC2*. Após esse período, ocorreu aglutinamento de colônias, inviabilizando novas medições.

Assim sendo, a avaliação da motilidade em presença do repressor glicose (Fig.4) mostrou que não houve alteração significativa ($P=0,5$) de comportamento entre as linhagens dentro de cada tratamento, sustentando a observação de que o efeito da depleção de ParB provoca pouca ou nenhuma perturbação no fenótipo da bactéria. O aumento significativo ($P<0,0001$) na motilidade em presença do repressor se explica

pelo aporte nutricional representado pela adição de glicose no meio.

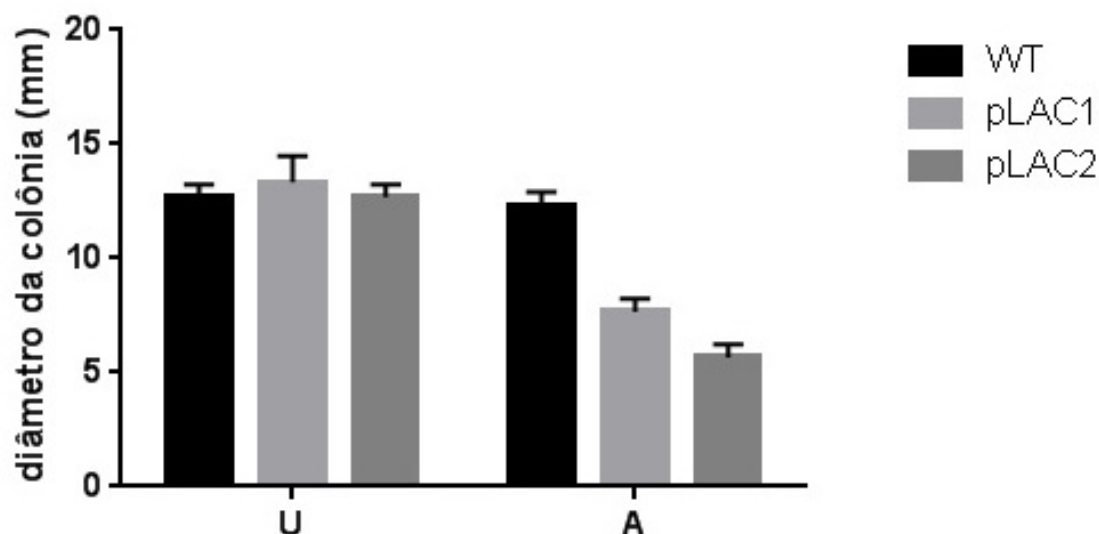
Figura 4 - Comparação do diâmetro médio das colônias de Xac WT (WT), Xac $\Delta parB$ /pLAC1 (pLAC1) e Xac $\Delta parB$ /pLAC2 (pLAC2) após 36h de incubação em condições de repressão por glicose (G) e controle (U).



Com 48h de incubação, a média de diâmetro das colônias das três linhagens era próxima de 13mm no tratamento controle. O crescimento da linhagem Xac WT em meio acrescido de arabinose não se alterou, enquanto a média de diâmetro das colônias de Xac $\Delta parB$ /pLAC1 e Xac $\Delta parB$ /pLAC2 foi reduzida para cerca de 8mm e 6mm, respectivamente.

Os testes de avaliação da motilidade mostraram, também, que a capacidade motora dos mutantes Xac $\Delta parB$ /pLAC1 e Xac $\Delta parB$ /pLAC2 foi reduzida significativamente ($P < 0,0001$) em relação à linhagem selvagem quando em presença do indutor arabinose (Fig.5); além disso, a linhagem Xac $\Delta parB$ /pLAC2 apresentou tendência a uma menor motilidade quando comparada ao mutante Xac $\Delta parB$ /pLAC1. É possível que a redução na capacidade motora seja devida à expressão de cópias extras de ParB pelos mutantes, sugerindo que o excesso da proteína exerceria maior influência sobre o desempenho de Xac que sua depleção (LACERDA, 2015).

Figura 5 - Comparação do diâmetro médio das colônias de Xac WT (WT), Xac $\Delta parB/pLAC1$ (pLAC1) e Xac $\Delta parB/pLAC2$ (pLAC2) após 48h de incubação em condições de indução por arabinose (A) e controle (U).



4.3 Avaliação da capacidade de formação de biofilme em placa

Para avaliar a capacidade de formação de biofilme em placa, a quantidade de biofilme formado (valor de densidade óptica após coloração) foi normalizada para uma mesma quantidade de células, permitindo assim a comparação entre diferentes linhagens e tratamentos. As médias dos valores do índice de normalização variaram de 0,4 em uma das réplicas até cerca de 15 em outra, porém não houve variação estatisticamente significativa entre as linhagens ou entre os tratamentos em cada uma das réplicas.

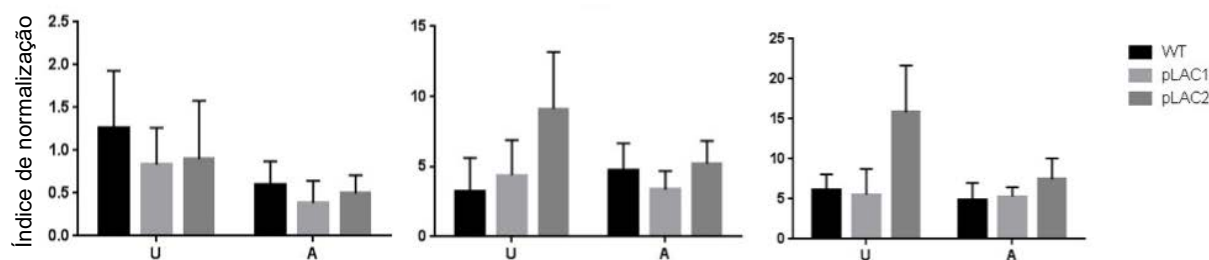
Os resultados dos testes de formação de biofilme em placa foram discrepantes (Fig.6), sugerindo, a princípio, que haveria diferença significativa ($P=0,0006$) entre os tratamentos - com (A) ou sem (U) indução de *parB* por arabinose -, com uma menor taxa de formação de biofilme quando o promotor encontrava-se presente no meio, sem diferenciação entre as linhagens ($P=0,1406$); este resultado seria esperado para as linhagens mutantes Xac $\Delta parB/pLAC1$ e Xac $\Delta parB/pLAC2$, porém foi incoerente no caso de Xac WT.

A análise de variâncias de uma segunda réplica do teste, porém, apresentou resultado oposto, indicando que as diferenças entre linhagens seriam significativas ($P=0,0005$) independentemente do tratamento ($P=0,1164$), sendo que a linhagem Xac $\Delta parB/pLAC2$ seria capaz de produzir maior quantidade de biofilme em relação às

outras duas linhagens; neste caso, porém, o teste t mostrou que a linhagem seria capaz de produzir uma quantidade significativamente maior ($P=0,0246$) de biofilme em ausência do açúcar indutor.

A terceira réplica, por sua vez, mostrou significância em ambas as variáveis, apontando novamente que a linhagem Xac $\Delta parB$ /pLAC2 seria capaz de produzir maior quantidade de biofilme em relação às outras duas linhagens ($P=0,0009$) e que também seria capaz de produzir maior quantidade de biofilme em ausência de arabinose ($P<0,0001$).

Figura 6 - Comparação dos índices de formação de biofilme de Xac WT (WT), Xac $\Delta parB$ /pLAC1 (pLAC1) e Xac $\Delta parB$ /pLAC2 (pLAC2) em condições de indução por arabinose (A) e controle (U) em diferentes réplicas.



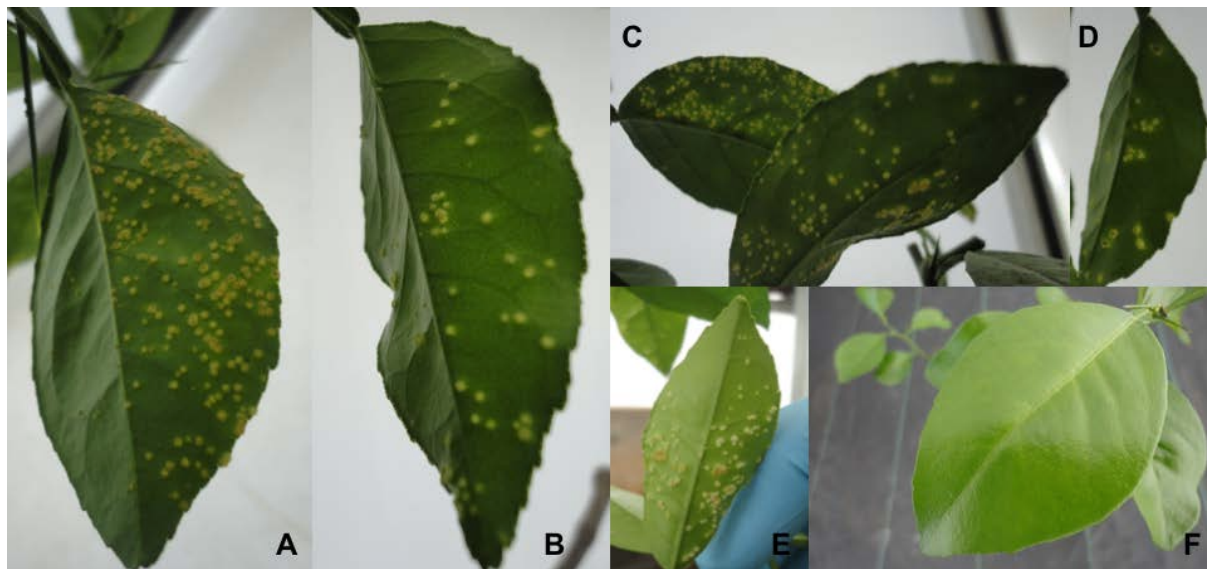
4.4 A depleção de ParB não leva à perda de patogenicidade de Xac

A fim de verificar se a depleção ou a ausência de ParB promoveriam perda da patogenicidade em Xac, plantas jovens de laranja-doce foram aspergidas com inóculos de a) Xac $\Delta parB$ /pLAC1 inibida com glicose; b) Xac $\Delta parB$ /pLAC2 inibida com glicose; c) Xac $\Delta parB$ /pLAC1; d) Xac $\Delta parB$ /pLAC2; e e) Xac WT, além do controle negativo sem inóculo.

Foi possível observar o desenvolvimento de manchas cloróticas (amareladas) eruptivas em todas as folhas e ramos inoculados (Fig.7), sendo que a manifestação dos sintomas se deu no mesmo momento em todas as linhagens e tratamentos. O controle negativo não apresentou sintomas.

As plantas aspergidas com a linhagem selvagem e linhagens mutantes de Xac apresentaram sintomas evidentes de cancro cítrico cerca de duas semanas após a aspersão. Não houve sinais de perda da patogenicidade nos mutantes sob condição de depleção ou ausência de ParB quando comparados à linhagem selvagem.

Figura 7 - Sintomas de cancro cítrico evidentes em plantas de laranja-doce aspergidas com A) *Xac* $\Delta parB$ /pLAC1 inibida com glicose; B) *Xac* $\Delta parB$ /pLAC2 inibida com glicose; C) *Xac* $\Delta parB$ /pLAC1; D) *Xac* $\Delta parB$ /pLAC2; e E) *Xac* WT e ausentes em F) controle negativo.



5. Considerações finais

O peptídeo TAP, utilizado como ferramenta para detecção de ParB em ensaios de western blot, mostrou exercer efeito deletério sobre o desenvolvimento de *Xac*. O efeito observado demonstra que o vetor replicativo utilizado em *Xac* $\Delta parB$ /pLAC2 provavelmente não é o mais adequado para estudos de expressão de proteínas em *Xac* e seu uso, quando necessário, deve levar tal efeito em consideração.

Comparando-se o comportamento das linhagens mutantes em presença (G) ou ausência (U) do repressor glicose podemos inferir que a) mesmo em ausência de glicose, o promotor se mantém reprimido e o fenótipo predominante é o de depleção de ParB; e/ou b) a depleção de ParB em *Xac* não provoca efeitos significativos; ou ainda, que c) tais efeitos não puderam ser detectados pelos testes realizados neste trabalho. Na interpretação dos resultados dos testes de patogenicidade, assumimos o que se estabelece em (a), porém, para garantir que os sintomas observados foram provocados por células com depleção/ausência de ParB são necessários estudos adicionais, como o western blot ou RT-PCR.

Os vetores replicativos inseridos em *Xac* $\Delta parB$ /pLAC1 e *Xac* $\Delta parB$ /pLAC2 são capazes de produzir cópias extras de ParB e podem levar a um excesso da proteína

na célula, provocando alterações potencialmente negativas; também neste caso, testes adicionais, como western blot, se fazem necessários para comprovar se há super-expressão da proteína na presença de arabinose em comparação à linhagem selvagem.

6. Referências

BADRINARAYANAN, A., LE, T.B., LAUB, M.T. Bacterial chromosome organization and segregation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2015. 31:171–99, 2015.

BARTOSIK, A. A. et al. ParB deficiency in *Pseudomonas aeruginosa* destabilizes the partner protein ParA and affects a variety of physiological parameters. *Microbiology*, v. 155, n. 4, p. 1080-1092, 2009.

BEHLAU, F., BELASQUE JÚNIOR, J., BERGAMIN FILHO, A. & LEITE JUNIOR, R.P. Incidência e severidade de cancro cítrico em laranja 'Pêra Rio' sob condições de controle químico e proteção com quebra-vento. *Fitopatologia Brasileira* 32:311-317. 2007.

BELASQUE Jr., J.; FERNANDES, N.G.; MASSARI, C,A,. The success of eradication campaign of citrus canker in São Paulo States, Brazil. *Summa Phytopathol.* 35:91–92. 2009.

BELASQUE Jr, J.; JESUS Jr, W.C. Concentração de inóculo e método de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Laranja*, v. 27, p. 263-272, 2006.

DA SILVA, A. C. et al. 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* 5(1):52-60. 2003.

DONOVAN, C. et al. Subcellular localization and characterization of the ParAB system from *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 13, p. 3441-3451, 2010.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Statistic Database. 2015. Disponível em <http://faostat3.fao.org/home/E>. Acesso em 14 de novembro de 2015.

FUNDECITRUS, Fundo de Defesa da Citricultura. Guia de fases de desenvolvimento vegetativo da planta de citros. Disponível em

www.fundecitrus.com.br/comunicacao/download_manual/25. Acesso em 19 de março de 2016.

GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H.; SCHUBERT, T.S. Citrus canker: the pathogen and it's impact. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV. 2002. Disponível em <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/>. Acesso em 24 de março de 2016.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. 2015. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>. Acesso em 14 de novembro de 2015.

LACERDA, L.A. Sistema para depleção de proteínas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2015. 54 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015.

LIVNY, J.; YAMAICHI, Y. ; WALDOR, M. K. Distribution of centromere-like *parS* sites in bacteria: insights from comparative genomics. Journal Bacteriology, v. 189, n. 23, p. 8693- 8703, 2007.

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

MOHL, D.A.; GOBER, J.W. Cell cycle-dependent polar localization of chromosome partitioning proteins in *Caulobacter crescentus*. Cell, v. 88, n. 5, p. 675-684, 1997.

SANCHES, A.L.R. *et al.* Análise econômica da prevenção e controle do cancro cítrico no estado de São Paulo. Rev. Econ. Sociol. Rural, Brasília, v.52, n.3, p.549-566, 2014.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; ATROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. com. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp.nov.nom. rev.comb.nov.; *X. campestris* pv *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var *fuscans*”

of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. Syst. Applied Microbiology 28(6):494-518. 2005.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; ATROMBERG, P.E.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A.K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Syst. Applied Microbiology 29(8):690-695. 2006.

SILVA, I.C.; REGASINI, L.O.; PETRÔNIO, M.S.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; BELASQUE Jr, J.; SACRAMENTO, L.V.S.; FERREIRA, H. Antibacterial Activity of Alkyl Gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. J Bacteriol. 195(1): 85–94. 2013.

SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: SWINGS J.G. & CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas* 121–156 Chapman & Hall, London, 1993.

UCCI, A. P.; MARTINS, P.M.M.; LAU, I.F.; BACCI Jr, M.; BELASQUE Jr, J.; Ferreira, H. MicrobiologyOpen. 3(1): 29–41. 2014.

Discente: Lúcia Bonci Cavalca

Orientador: Henrique Ferreira