UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

METODOLOGIA DE BUSCA PARA GENE DE COMPONENTE HORMONAL EM *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, BACTÉRIA CAUSADORA DO CANCRO CÍTRICO

JOSÉ SOARES JUNIOR

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)

Junho – 2011

JOSÉ SOARES JUNIOR

METODOLOGIA DE BUSCA PARA GENE DE COMPONENTE HORMONAL EM *Xanthomonas axonopodis* pv. citri, BACTÉRIA CAUSADORA DO CANCRO CÍTRICO

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

Orientador: Dr. Alexandre Morais do Amaral
Co-orientador: Dr. Henrique Ferreira

Rio Claro
2011

576 Soares Júnior, José
S676m Metodologia de busca para gene de componente hormonal em Xanthomonas axonopodis pv. citri, bactéria causadora do cancro cítrico / José Soares Júnior. - Rio Claro : [s.n.], 2011
55 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Alexandre Morais do Amaral
Co-Orientador: Henrique Ferreira

1. Microorganismos. 2. Auxina. 3. Mutantes. 4. Fitopatógeno. I. Título.

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

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Metodologia de busca para gene de componente hormonal em Xanthomonas axonopodis pv. citri, bactéria causadora do cancro cítrico

AUTOR: JOSÉ SOARES JUNIOR
ORIENTADOR: Prof. Dr. ALEXANDRE MORAIS DO AMARAL
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ALEXANDRE MORAIS DO AMARAL
EMBRAPA-IAC - Cordeirópolis

Prof. Dr. NELSON WULFF
Fundo de Defesa da Citricultura - Araraquara

Prof. Dr. DARIO ABEL PALMIERI
Depto de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis

Data da realização: 06 de maio de 2011.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Rio Claro e ao Centro APTA Citros Sylvio Moreira pela oportunidade e o apoio dado durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Morais do Amaral pela oportunidade e orientação na realização deste trabalho.

Ao Dr. Henrique Ferreira pela orientação e apoio em diversos momentos desta jornada.

À Dra. Valdenice Moreira Novelli pelo apoio e oportunidade de estágio no Centro APTA Citros Sylvio Moreira.

À Msc. Paula Maria Moreira Martins pelo apoio, dedicação e contribuição na realização deste trabalho. Muito obrigado mesmo!

À banca de exame de qualificação, composta por: Dr. Henrique Ferreira, Dra. Ana Carla Oliveira da Silva e Dr. Vanderlei Geraldo Martins, pelas sugestões, críticas e contribuições para o trabalho.

À banca de defesa de dissertação, composta por: Dr. Alexandre Morais do Amaral, Dr. Nelson Wulff e Dr. Dario Abel Palmieri, pelas críticas e contribuições para o trabalho.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – pela bolsa concedida.

À minha mãe que sempre me apoiou, incentivou e fez o possível para eu ter o melhor.

À minha namorada Íris, pelo seu carinho, conselhos, apoio, paciência e por tantos momentos bons vividos juntos.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O cancro cítrico é uma doença de importância mundial para o cultivo de laranjas e seu agente causador é a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. Embora todos os genes presentes nessa bactéria já tenham sido sequenciados, grande parte destas sequências não apresenta qualquer informação experimental sobre a contribuição para o sucesso da instalação do patógeno na planta hospedeira. Por outro lado, torna-se cada vez mais evidente que várias bactérias fitopatogênicas utilizam mecanismos de adaptação de origem genética que podem induzir efeitos fisiológicos na planta e adequar o ambiente de tal forma que permita a ocorrência da doença. Dentre estes mecanismos, está a possibilidade da bactéria produzir substâncias que se assemelhem a hormônios vegetais, como a auxina (AIA). O objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologia genômica de busca para investigar se há genes que codificam para a produção de compostos iguais ou semelhantes a este hormônio em *X. axonopodis* pv. citri e se a sua participação no processo de patogênese é fundamental para o sucesso da infecção. Para tal, foi produzida coleção de mutantes genéticos funcionais aleatoriamente em *X. axonopodis* pv. citri, com posterior submissão desta mesma coleção a teste de produção de auxina utilizando o reagente Salkowski. Após produção e análise de grupo de mutantes dirigidos e coleção de aproximadamente 14200 mutantes aleatórios não foi detectada linhagem defectiva para a produção de AIA ou composto semelhante. Os resultados obtidos neste estudo, no entanto, mostram que a biossíntese do composto em *X. axonopodis* pv. citri é dependente do triptofano e que existe uma concentração ótima deste aminoácido a ser adicionado no meio de cultura para que a bactéria realize a biossíntese. Este é o primeiro estudo que propõe a investigação sistemática de produção de composto com ação hormonal em *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.

Palavras-chave: cancro cítrico. *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. auxina. mutantes

ABSTRACT

The citrus canker is a disease of global significance for the cultivation of oranges and its causative agent is the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. Although all the genes present in this bacterium have been sequenced, most of these sequences have no experimental information regarding the contribution to the successful installation of the pathogen on the host plant. On the other hand, it has been clearly demonstrated that several pathogenic bacteria use adaptative mechanisms that can induce physiological effects in plants and adjust the environment in a way that allows the occurrence of the disease. Among these mechanisms there is the possibility the bacteria produce substances that are similar to plant hormones such as auxin (IAA). The objective of this study was to develop a screening methodology to investigate the presence of genes that code for a compound identical or similar to auxins in *X. axonopodis* pv. citri as well as if it plays a role during the pathogenesis process. The main goal of this study was to produce a collection of random and directed genetic mutant strains of *X. axonopodis* pv. citri for the screening of auxin production by using the Salkowski reagent. After production and analysis of the group of mutants, including a collection of approximately 14,200 random mutant strains, defective production of IAA or similar compound was not detected. On the other hand, the results of this study show that such compound mimics effects of hormonal properties in *X. axonopodis* pv. citri and is dependent of tryptophan. In addition, it is shown that there is an optimum concentration of this amino acid to be added in the culture medium for the bacteria to carry out biosynthesis. To our knowledge, this is the first study to investigate systematically the production of auxin-like compounds in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.

Keywords: citrus canker. *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. auxin. mutants

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO 1

1.1 A citricultura 1

1.2. O cancro cítrico 3

1.3. A bactéria do cancro 7

1.4. A patogenicidade 9

1.5. Estômatos como via de infecção 10

1.6. Vias metabólicas de produção de AIA 12

1.7. Transformação genética em bactérias 14

1.8. Considerações sobre o genoma de *X. axonopodis* pv. citri 16

2. MATERIAL E MÉTODOS 19

2.1. Seleção de meio de cultivo para expressão de composto hormonal 19

2.2. Detecção de AIA com reagente de Salkowski 20

2.3. Produção de mutantes funcionais 20

2.4. Seleção *in vitro* para mutantes na produção de AIA 21

2.5. Mutagênese dirigida 24

3. RESULTADOS 26

3.1. Seleção de meio de cultivo para expressão de composto hormonal 26

3.2. Produção e seleção de mutantes funcionais a partir de coleção de linhagens com modificações genéticas aleatórias 27

3.3. Detecção de composto com reagente de Salkowski 28

3.4. Mutagênese dirigida 29

4. DISCUSSÃO 31

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 37

1. INTRODUÇÃO

1.1 A citricultura

Com origem em regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático, há séculos as plantas de citros (família Rutaceae) se espalharam por diversos países do globo (MATTOS JUNIOR et al., 2005). Ao espalharem-se pelo mundo, os citros sofreram mutações que deram origem a novas variedades e, por meio do cultivo de sementes, foram modificados aleatoriamente o aroma, a cor, o sabor e o tamanho dos frutos (HASSE, 1987). Atualmente, os pomares com maior produtividade, resultantes de uma citricultura estruturada, estão localizados em regiões de clima tropical e sub-tropical, destacando-se o Brasil, Estados Unidos, Espanha, México, China e África do Sul, sendo o Estado de São Paulo e a Flórida as principais regiões produtoras do mundo (HASSE, 1987; NEVES et al., 2010).

O Brasil é o maior produtor mundial de citros com aproximadamente 25% da produção de laranja do mundo. O País é também o maior exportador de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC), com aproximadamente 50 % do volume de suco produzido no mundo. Além disso, a citricultura brasileira apresenta área cultivada de cerca de 900 mil hectares, gera mais de 230 mil empregos diretos no campo, indústria e infra-estrutura e exporta SLCC, o que rende de 1,5 à 2 bilhões de dólares anualmente ao país (NEVES et al., 2010), representando a segunda atividade rural em importância no Estado de São Paulo, menor apenas que a cana-de-açúcar (SAA, 2008). Aliás, o Estado de São Paulo concentra 79% da produção brasileira de laranja, sendo responsável por 53% da produção mundial de suco de laranja (NEVES et al., 2004; NEVES et al., 2010).

Apesar do grande potencial econômico e produtivo dessa cultura, os citros são suscetíveis a um grande número de doenças, dentre as quais algumas com alto potencial de destruição, como a tristeza, que dizimou milhões de pomares no Brasil na década de 1930, a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xyllela fastidiosa* (LARANJEIRA e PALAZZO, 1999), cujo sequenciamento completo do genoma (SIMPSON et al., 2000) permitiu ao Brasil ingressar no até então seleto grupo de países detentores de tecnologia de sequenciamento genômico, e o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (BRUNINGS e GABRIEL, 2003; GRAHAM et al., 2004). Ainda, pode-se citar outras doenças como a leprose, a morte súbita dos citros causada pelo vírus CSDaV (MACCHERONI et al., 2005), a mancha

preta e, mais recentemente, o Huanglongbing (HLB), severa e principal doença de citros hoje no mundo. Em alguns casos, inclusive, a ocorrência de doenças como o cancro cítrico e o HLB pode servir como instrumento na imposição de barreiras não-tarifárias por países importadores.

Embora o cancro cítrico seja uma doença presente no Brasil desde a década de 1950, ainda hoje são utilizados cerca de 50 milhões de dólares anualmente com o controle da doença, principalmente através da erradicação e medidas de prevenção. Por ser uma doença quarentenária, apresenta também uma série de restrições do ponto de vista de mercado externo, o que pode limitar consideravelmente a exportação de produtos cítricos.

A doença é causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. citri, um organismo que se caracteriza basicamente pela formação de lesões circulares do tipo cancro, eruptivas, corticosas, de coloração parda e circundadas por halo amarelo nos tecidos jovens de citros, como folhas, epicarpo e caules (Figura 1). Em casos mais severos da doença, pode haver a seca de ramos e queda acentuada de frutos.

Curiosamente, embora a bactéria seja considerada altamente agressiva, seu único hospedeiro é a planta de citros e as únicas formas de penetração no tecido vegetal são através de aberturas estomáticas e ferimentos ocasionados na superfície dos tecidos (lesão de inseto, espinhos ou abertura provocada por material cortante, como ferramentas de colheita).

Sabe-se que durante a interação de algumas bactérias com seus hospedeiros, ocorre uma série de modificações induzidas pelo microrganismo no micro-ambiente vegetal, que podem permitir a sua melhor adaptação, incluindo alterações na abertura estomática (VINATZER e YAN, 2008).

Ainda não se sabe se a bactéria do cancro cítrico, durante a interação com a estrutura vegetal, é capaz de provocar algum tipo de alteração na abertura estomática a ponto de facilitar a sua entrada no tecido, embora evidências indiquem que a bactéria produz substâncias que se assemelham à hormônios (FETT et al., 1987; COSTACURTA et al. 1998; VINATZER e YAN, 2008) que, por sua vez, podem apresentar atividades envolvidas com tais mecanismos na planta (WEINGART e VOLKSCH, 1997; SERGEEVA et al., 2002; BROOKS et al., 2005).

Até o momento, não há estudos sistemáticos para a identificação de componentes genéticos presentes em *X. axonopodis* pv. citri envolvidos na modulação de tais aberturas,

embora tais orifícios desempenhem papel essencial no sucesso da infecção do tecido vegetal dos citros.

1.2. O cancro cítrico

O cancro cítrico é considerado uma das mais importantes doenças que ameaçam a produção da cultura de citros. Ao longo de sua história, a doença tem ganhado atenção especial por parte dos produtores, indústrias, governos, técnicos e pesquisadores, pois tem causado grandes prejuízos para a produção de citros no Brasil e no Mundo e resultando na erradicação de grande número de plantas (LEITE JR., 2000; SCHUBERT et al., 2001; BRUNINGS e GABRIEL, 2003). No final da década de 1950, o patógeno responsável pelo cancro cítrico foi encontrado no Brasil, possivelmente introduzido por meio de mudas oriundas clandestinamente do Japão (HASSE, 1987). A ocorrência de furacões em determinadas regiões, como acontece no estado da Flórida, principal produtor de laranja dos EUA, facilita a disseminação do agente causal. Isso permitiu a ocorrência recente de novos focos da doença nos pomares daquele estado (IREY et al., 2005).

A doença ocorre nos citros e em seus aparentados, afetando diversas variedades de importância comercial, tais como laranjas, limões, limas e pomelos, entre outros (AMARAL, 2003). No entanto, algumas variedades são mais suscetíveis do que outras. Como exemplos, podemos citar a lima ácida que é altamente suscetível enquanto que a tangerina é moderadamente resistente (DAS, 2003).

Causado por uma bactéria bastante agressiva e que se dissemina rapidamente pelo ambiente, o cancro encontra-se presente em culturas de citros de diversas partes do mundo, o que inclui países líderes na produção de laranja para a indústria de suco, como o Brasil e os Estados Unidos. Apesar de os primeiros relatos do cancro no território brasileiro datarem do final da década de 1950 (BITANCOURT, 1957), até os dias atuais a doença tem reaparecido nos pomares e provocado a implementação de medidas legais rígidas para o seu controle. Além da produção de frutos para suco, as exportações de frutos frescos também são afetadas, fazendo com que as importações sejam realizadas por meio de uma série de exigências (BAPTISTA, 2006). Estas exigências decorrem do fato de que o Brasil ainda não é considerado um país livre de doenças importantes e potencialmente devastadoras, como o cancro cítrico (NEVES et al., 2001).

A bactéria *X. axonopodis* pv. citri apresenta diversas particularidades quanto a sua capacidade de disseminação, sobrevivência e virulência. Ela pode sobreviver nas bordas das lesões que provoca, mas, no entanto, morre rapidamente quando exposta diretamente à luz do sol e/ou ao dessecamento na superfície do órgão vegetal. A sua sobrevivência é de apenas alguns dias quando presente no solo e de alguns meses quando incorporada juntamente com o tecido vegetal no solo, possivelmente devido à competição com organismos saprofíticos. A bactéria pode sobreviver por vários anos em tecidos vegetais que se apresentam dessecados e livres de solo (GOTO, 1992), entretanto, a principal fonte de inóculo é, sem dúvida, a resultante da erupção das pústulas foliares (DAVIES e ALBRIGO, 1994).

A infecção primária pelo patógeno acontece nos tecidos jovens, sendo provida por células bacterianas presentes em infecções velhas nas folhas e nos ramos de plantas doentes. A ocorrência de lesões de cancro é favorecida em períodos chuvosos, pois a bactéria exsuda de lesões velhas e alcança os tecidos jovens da planta, altamente suscetíveis a bactéria. Além de causar a redução da superfície foliar, o acometimento da planta pelo cancro cítrico leva à queda de frutos, inclusive quando pequenos, ou ainda à presença de rachaduras nas cascas, por onde podem penetrar agentes secundários causadores de podridões, resultando na sua queda e prejudicando a sua aceitação para o consumo. Em um determinado local, a bactéria pode ser disseminada por meio de chuvas e ventos, água de irrigação, equipamentos contaminados, insetos e, a longa distância, pelo transporte de mudas, ferramentas, roupas e veículos contaminados. Assim como ocorre na maioria das doenças bacterianas de plantas, o cancro é altamente influenciado pelas condições ambientais de umidade e temperatura, além da idade e variedade cítrica (BAPTISTA, 2006). A bactéria é capaz de causar a doença em uma vasta diversidade de espécies de citros e, principalmente, nas variedades de laranjas doces (Baianinha e Hamlin), limão Galego e pomelos. Ainda, o desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas próximas à 28ºC e chuvas pesadas, onde a infecção pode se tornar extremamente severa (RODRIGUES NETO e RIBEIRO, 2002; AMARAL, 2003).

Em condições abaixo das ideais, os primeiros sintomas podem ocorrer até mais de 60 dias após a inoculação (GOTO, 1992). Basicamente, folhas e ramos são mais suscetíveis à doença nas seis primeiras semanas após o início do crescimento, enquanto os frutos, 90 dias após a queda das pétalas (TIMMER et al., 2000). Após esta fase, a planta apresenta maior facilidade em resistir à infecção.

A infecção é estabelecida, principalmente, pela entrada do patógeno em orifícios naturais, como os estômatos, ou em orifícios provenientes de danos mecânicos, como o rasgamento das folhas. Os sinais iniciais, visíveis na superfície abaxial das folhas, onde estão presentes os estômatos, é caracterizado pela formação de pequenas pústulas circulares e oleosas, com até 1 mm de diâmetro. Com o tempo, a lesão aumenta de tamanho e forma pústulas na forma de erupções com relevo áspero e de coloração marrom no seu interior e um halo circundante de cor amarela que, no entanto, pode desaparecer.

A formação do cancro é causada pela excessiva divisão celular (hiperplasia) no mesófilo foliar, onde houve a infecção, provocando o rompimento da epiderme e seu surgimento em forma de erupção, no centro da lesão. As mesmas alterações de textura e de coloração, durante todo o processo, também é observada na região correspondente à lesão no lado oposto da folha (superfície adaxial). As lesões observadas nos frutos assemelham-se as ocorridas nas folhas, contudo, nos ramos elas tendem a apresentar coalescência, ou seja, agrupam-se formando lesões de formato irregular e com maior extensão, além de não apresentarem nítida formação do halo amarelo.

O controle do cancro cítrico deve-se basear principalmente na prevenção, que considera o modo de introdução do patógeno em uma área e sua disseminação. Algumas medidas são realizadas para evitar a entrada do patógeno, como a desinfestação de material de colheita (sacolas, escadas, caixas, etc.), veículos, ferramentas e vestuário, através da instalação de pedilúvios e rodolúvios, além do controle da procedência dos veículos que entram no pomar. A utilização de quebra-ventos ao redor da área de cultivo de citros também é incentivada, pois dificulta a dispersão da bactéria pelo vento e consequentemente evita os danos que a bactéria possa causar na planta. Outra alternativa é a produção, seleção e plantio de citros tolerantes ao cancro e que tenham reconhecido valor comercial, como as tangerinas Ponkan e Satsuma e algumas variedades de laranja doce, como a ‘Folha Murcha’.

Em virtude do aumento acentuado do número de focos de cancro cítrico após o ingresso no País, em 1996, da larva minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariida), inseto que constrói galerias sob a cutícula das folhas novas das plantas de citros, as quais servem de porta de entrada para a bactéria, a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC) determinou a aplicação de um único método de controle para essa doença no Estado de São Paulo. Esse consiste na erradicação das plantas doentes e todas as demais contidas num raio de 30 metros ao redor do foco, ou a erradicação

total do talhão caso o mesmo apresente mais que 0,5% de plantas infectadas. Nestes dois casos, o plantio de citros na área erradicada fica proibido por três anos (ROSSETTI, 2001). Até o momento, não há descrição de vetor capaz de transportar a bactéria do cancro cítrico e provocar a doença em plantas (BELASQUE JÚNIOR, 2005).

Provavelmente oriundo dos mesmos centros de origem dos citros, ou seja, sul da China, Indonésia e Índia, o cancro cítrico ocorre em quase todo o mundo, o que inclui a América do Sul, Estados Unidos, Japão, Nova Zelândia, África, entre outros (GOTO, 1992). Embora não haja ainda consenso mundial quanto a sua taxonomia, a classificação corrente tem considerado três "tipos" ou patovares diferentes de cancro: A, B e C. O cancro tipo A, ou cancro cítrico asiático, é o principal e mais severo tipo presente nos pomares e é causado pela bactéria *X. axonopodis* pv. citri. O tipo B, cancrose B ou "falso cancro", tem como principal hospedeiro o limão Galego, podendo ocorrer em laranja Azeda, entre outros, e é restrito à Argentina, ao Paraguai e ao Uruguai. O tipo C, cancrose C ou "cancro do limão Galego", infecta somente o limoeiro Galego e esta restrito ao Brasil. Atualmente, as patovares que causam os tipos B e C são denominadas *X. axonopodis* pv. aurantifolii (RODRIGUES NETO e RIBEIRO, 2002).

Caracterizado pelo Brasil como praga quarentenária A2, na 11ª reunião do Grupo de Trabalho Permanente em Quarentena Vegetal, realizada em 1995, na cidade de Montevidéu (RODRIGUES NETO e RIBEIRO, 2002), a presença do cancro cítrico pode ser um argumento dos países importadores de citros para a imposição de barreiras fitossanitárias, limitando o comércio internacional. Praga quarentenária significa "qualquer agente patogênico com importância econômica potencial para a área posta em perigo e que ainda não esteja presente ou, se estiver, não se encontre amplamente distribuída e sob controle ativo oficial".

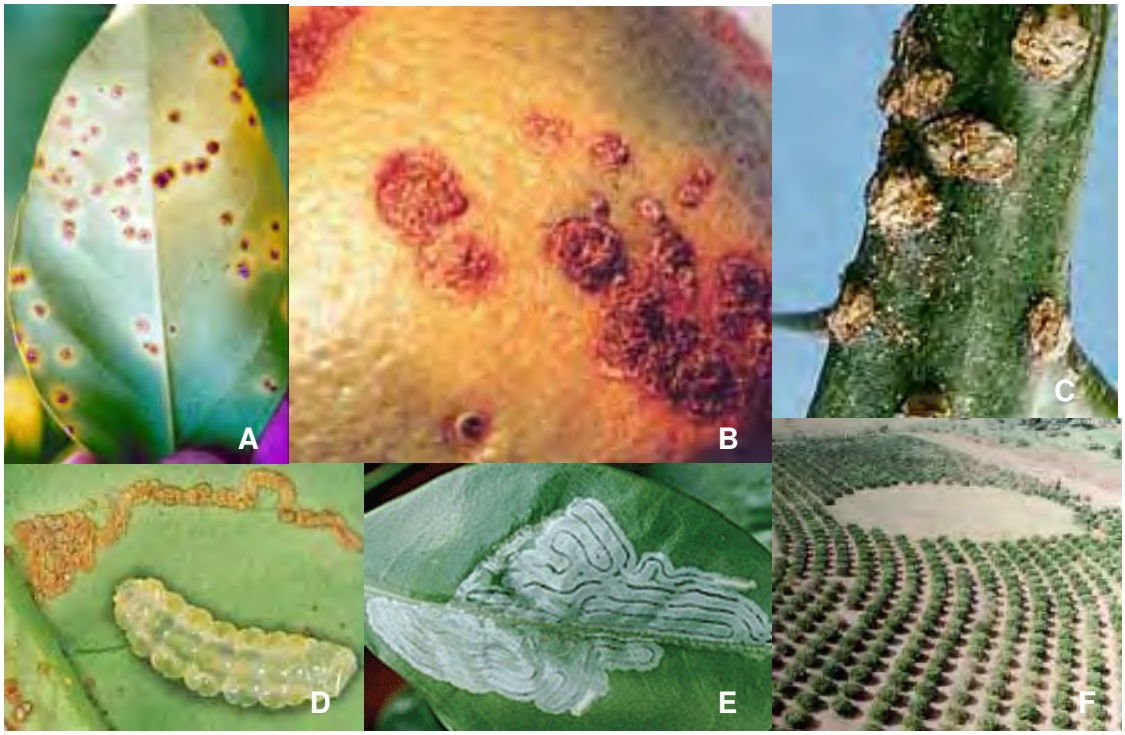

Figura 1. Lesões causadas em plantas de citros pela incidência de cancro cítrico. **A**. Folha (superfície abaxial); **B.** Fruto; **C**. Caule; **D** e **E.** Galerias formadas por ação da larva minadora em folhas de citros; **F.** Erradicação dos focos da doença em pomares (Fonte: Fundecitrus).

1.3. A bactéria do cancro

A bactéria *X. axonopodis* pv. citri (VAUTERIN et al., 1995) é um procarioto em forma de bastonete, uniflagelado, Gram negativo e aeróbio obrigatório que pertence à classe gamma de Proteobactérias. Possui dois plasmídeos: pXAC33 e pXAC64 contendo 33.699 e 64.920 bases, respectivamente e um cromossomo circular com aproximadamente 5.2 Mb. Apresenta colônias amarelas e mucóides em meios de cultura artificiais (Figura 2) (RODRIGUES NETO e RIBEIRO, 2002) devido à presença de um pigmento chamado xantomonadina, o qual provavelmente protege a bactéria de possíveis danos que possam ser causados pela luz (BUTTNER e BONAS, 2010).

Essa bactéria afeta particularmente órgãos em estágios de pleno crescimento. Alta umidade e temperaturas em torno de 28^{o}C favorecem seu desenvolvimento, o que torna os climas tropicais e sub-tropicais, ou seja, os ambientes predominantes da citricultura mundial, inclusive do Brasil, altamente favoráveis à sua sobrevivência (TIMMER et al., 2000;

PRUVOST et al., 2002; VERNIÈRE et al., 2003), que pode durar até 9 meses em folhas de citros caídas, ervas invasoras ou restos de cultura (ROSSETTI, 2001).

A bactéria é de fácil disseminação e tem a capacidade de colonizar a superfície de citros de maneira epífita, isto é, sem causar a doença, até poder penetrar nos tecidos do hospedeiro (GRAHAM et al., 2004). Depois de presente sobre seu hospedeiro, a bactéria inicia o processo de infecção, cuja primeira etapa é a penetração na planta. Em seguida, quando presente no espaço intercelular, inicia-se processo de ativação da expressão de genes implicados na patogenicidade e virulência contra o hospedeiro (DUAN et al., 1999). Em outras espécies de *Xanthomonas*, tais como *X. campestris* pv. campestris, produtos da própria bactéria, como a goma xantana (presente também em *X. axonopodis* pv. citri), podem interferir na capacidade da planta-hospedeira em resistir à colonização da bactéria (YUN et al., 2006).

Devido à sua importância econômica, a bactéria teve seu genoma completamente seqüenciado (DA SILVA et al., 2002), onde foram identificados, por homologia de seqüências de proteínas, várias ORFs ("open reading frames" ou “seqüências de leitura aberta”) associadas diretamente ao processo de infecção e que podem permitir a sua sobrevivência e favorecer a sua capacidade de causar a doença na planta de citros (BAPTISTA, 2006).

Figura 2. Aspecto visual de células e colônias de *X. axonopodis* pv. citri. (a) Microscopia eletrônica e (b) colônias em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Nutriente (Fonte: E. Kitajima e A. M. do Amaral).

1.4. A patogenicidade

O trabalho de descrever os mecanismos de patogenicidade e virulência nas bactérias fitopatogênicas torna-se difícil devido ao grande número de bactérias, as quais podem ser espécies Gram-positivas ou negativas e o alto número de patovares. Estas bactérias na sua maioria pertencem aos gêneros *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Leifsonia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* e *Xylella*. Os sintomas observados, como murcha, podridão, amarelecimento, cancro, necrose, manchas foliares e tumores são características do patossistema em questão e representa o resultado da interação dos mecanismos de patogenicidade da bactéria e as defesas da planta (BAPTISTA, 2006).

Para o entendimento de uma doença, o conhecimento do processo de patogênese e a caracterização de proteínas envolvidas direta ou indiretamente em tal processo é de grande importância. Atualmente, o estudo da colonização do hospedeiro por organismos que produzem tais proteínas tem sido realizado com o auxílio da genômica (BRUMBLEY et al., 2004; CHO et al., 2006). No caso de bactérias fitopatogênicas extracelulares, o sucesso da infecção está diretamente relacionado com proteínas que de alguma maneira auxiliam na interação planta-bactéria, isto é, "proteínas efetoras" (DEBROY et al., 2004; MINSAVAGE et al., 2004).

O entendimento da virulência de várias bactérias fitopatogênicas tem sido auxiliado pela análise genômica em associação com a análise biológica de potencias genes envolvidos com a infecção bacteriana, como aqueles responsáveis pela adaptação da bactéria na superfície foliar e a secreção de proteínas que causam diretamente a lesão, (OKINAKA et al., 2002; GAURIVAUD et al., 2002). Além disso, existe o incentivo da exploração dos dados disponíveis com o uso de ferramentas úteis na análise biológica como a mutação genética (THANASSI et al., 2002; YOUNG e DONG, 2003) para identificação de genes que codificam, por exemplo, hormônios que podem interferir no processo de colonização da planta.

No caso do cancro cítrico, embora durante a anotação do genoma da bactéria tenham sido encontradas diversas sequências homólogas a genes envolvidos no processo de virulência, o que sugere alguma função na bactéria, não existe ainda informação da importância ou funcionalidade de tais proteínas no processo de colonização, embora cada vez

mais seja indicada a possibilidade destas enzimas funcionarem no processo de virulência (JHA et al., 2005; LIU et al., 2005).

Apesar da patogenicidade e virulência de *X. axonopodis* pv. citri estarem fortemente ligadas com a atividade de um simples gene de avirulência (pthA) (SWARUP et al., 1991; SWARUP et al., 1992; De FEYTER et al., 1993; KANAMORI e TSUYUMU, 1998), pouco se sabe sobre os demais produtos gênicos envolvidos nesse processo. O estudo da transcrição desses genes seria uma boa alternativa para identificar todos os elementos envolvidos na patogenicidade e virulência desta bactéria (BAPTISTA, 2006).

1.5. Estômatos como via de infecção

Diversas bactérias fitopatogênicas podem sobreviver e proliferar como epífitas na superfície da planta sem causar doença. Epífitas estritas podem completar o seu ciclo de vida sobre a superfície das folhas e geralmente não são capazes de colonizar o apoplasto foliar (BEATTIE e LINDOW, 1995; BEATTIE e LINDOW, 1999). Em contrapartida, patógenos foliares como *Pseudomomas syringae* podem se multiplicar de forma agressiva no apoplasto, levando ao desenvolvimento da doença em condições favoráveis (HIRANO e UPPER, 2000) (Figura 3). Há diversas aberturas naturais na superfície foliar, através das quais os patógenos bacterianos podem penetrar no espaço intercelular da planta, incluindo hidatódios, estômatos, lenticelas e outros. Entre as aberturas naturais, os estômatos dominam em número a parte aérea da planta e, portanto, representam uma das mais importantes possíveis vias de entrada do patógeno na planta (AGRIOS, 2005; MELOTTO et al., 2008). A densidade de estômatos na superfície foliar varia entre as espécies vegetais e é regulada pelo desenvolvimento da planta e em resposta às mudanças ambientais (WOODWARD, 1987; LAKE et al., 2001). Pode haver até 300 estômatos por mm^2 na superfície das folhas e estes podem ocupar até 2% da área da superfície foliar (NOBLE, 1974; WOODWARD, 1987; LAKE et al., 2001).

Até recentemente, pensava-se que os estômatos seriam uma porta estritamente passiva e que as bactérias pudessem invadir o tecido vegetal livremente por essas aberturas. No entanto, estudos constataram que em *Arabdopsis* os estômatos se fecham em resposta à presença de bactérias e patógenos (MELOTTO et al., 2006). Neste fechamento dos estômatos estariam envolvidos hormônios produzidos pela planta, como o ácido salicílico e o ácido

abscísico (ABA). Células-guarda podem perceber bactérias, incluindo *Pseudomonas syringae*, e fechar um número significativo de estômatos, sugerindo que as plantas têm evoluído mecanismos para reduzir a entrada de bactérias no seu interior. Estas observações indicam que os estômatos não são meras portas passivas de entrada de bactérias para o interior da planta. Além disso, sugere-se que a abertura estomática é influenciada por uma série de fatores como umidade, concentração de CO_2, luminosidade, presença de patógenos, hormônios vegetais, entre outros (MELOTTO et al., 2008).

A influência do hormônio ácido indolacético (AIA) na distribuição e no processo de abertura dos estômatos tem sido relatada na literatura (IRVING et al., 1992; VANDENBUSSCHE e VAN DER STRAETEN, 2004; ACHARYA e ASSMANN, 2009). A auxina normalmente desempenha função de regulador positivo no processo de abertura estomática, embora altas concentrações de auxina exógena possam inibir tal abertura (LOHSE e HEDRICH, 1992). Além disso, tem sido observado papel antagônico entre a auxina e o ABA no processo de regulação da abertura estomática: a auxina reprime o fechamento da abertura estomática em resposta ao ABA (SNAITH e MANSFIELD, 1982; ACHARYA e ASSMANN, 2009), isto é, quando a planta produz o ABA em resposta à presença do patógeno, promovendo o fechamento dos estômatos, a auxina impede este fechamento, o que pode facilitar a penetração do patógeno no tecido vegetal.

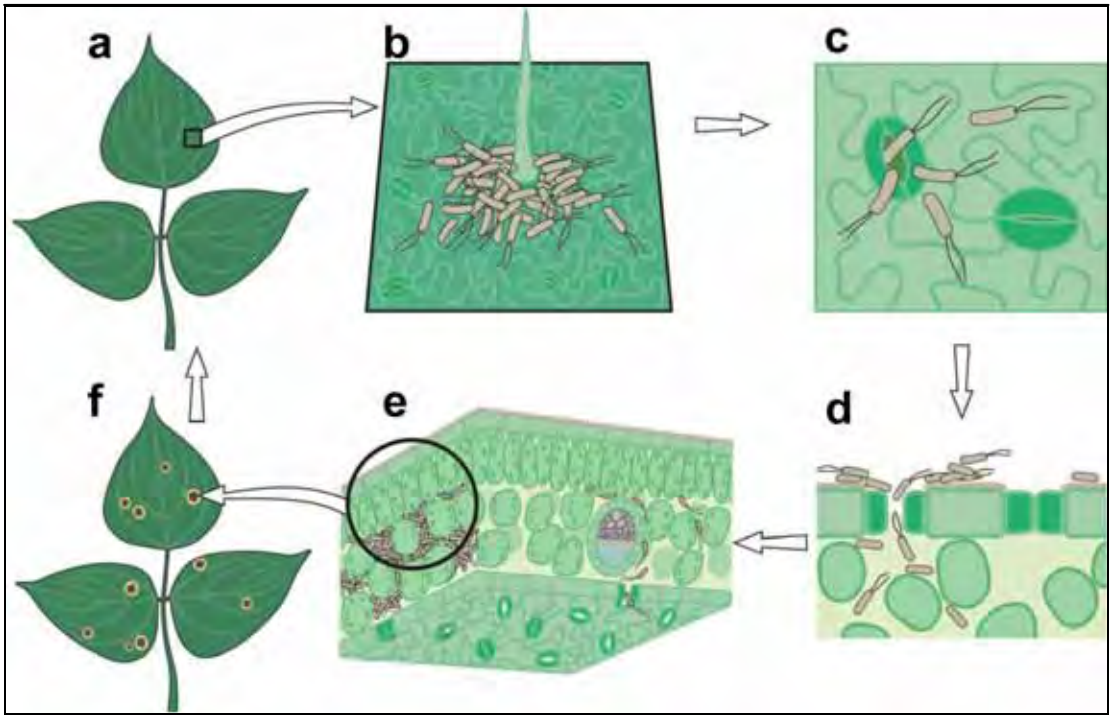

Figura 3. Esquema simplificado do ciclo de infecção de *Pseudomonas syringae.* (a) folhas saudáveis; (b) células bacterianas agregadas próximas a um tricoma na superfície da folha; (c) bactérias penetrando no tecido vegetal através de estômato aberto; (d) seção transversal de folha mostrando bactérias colonizando o apoplasto foliar; (e) extensa multiplicação de células bacterianas no apoplasto foliar; (e) doença visível (necrose e clorose) (Fonte: MELOTTO et al., 2008).

1.6. Vias metabólicas de produção de AIA

A auxina é um termo fisiológico que abrange todos os reguladores de crescimento, naturais ou artificiais, que estimulam o crescimento de coleóptilos em plantas (WENT e THIMANN, 1937; GUTJAHR et al., 2005). Sem dúvida, a auxina natural mais importante é o ácido indolacético (AIA), um composto encontrado em bactérias, fungos, plantas e animais, mas tendo propriedades reguladoras de crescimento somente em plantas (KAPER e VELDSTRA, 1958; GRUEN, 1959; ARSHAD e FRANKENBERGER, 1991; COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995).

A capacidade de produzir AIA é muito difundida entre os microrganismos associados à plantas (GRUEN, 1959; FETT et al., 1987). Em muitas espécies de bactérias, as funções da auxina na interação planta-microrganismo parecem ser bastante diversas. Estudos moleculares e bioquímicos de síntese bacteriana de AIA têm fornecido pistas sobre as interações entre plantas e bactérias produtoras do hormônio, variando de patogênese à fitoestimulação. Em

diversos microrganismos, incluindo *Agrobacterium tumefaciens, A. rhizogenes, Pseudomonas syringae* pv. savastanoi*, P. syringae* pv. syringae e *Erwinia herbicola* pv. gypsophilae (Ehg), AIA está envolvida em processos de patogênese (MORRIS 1986; FETT et al., 1987; WHITE e ZIEGLER 1991; CLARK et al., 1993; MAZZOLA e WHITE, 1994).

Estudos demonstraram que *X. axonopodis* pv. citri é capaz de estimular a divisão celular em tecidos de plantas infectadas, resultando em lesões hiperplásticas (DIENELT e LAWSON, 1989; LAWSON et al., 1989). Em diversos estudos, lesões hiperplásticas resultantes da proliferação de células do tecido vegetal apresentaram correlação com a biossíntese de fitohormônios pela bactéria infectante (MAZZOLA e WHITE, 1994; COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995). Fett et al. (1987) relataram que estirpes de *Xanthomonas* são capazes de biossintetisar baixas concentrações de AIA.

Diversas vias metabólicas para a biossíntese de AIA derivadas do L-Triptofano já foram propostas (Figura 4) (NORMANLY et al., 1997; LJUNG et al., 2001; ZHAO, 2010), sendo que a via da indoleacetamida (IAM) é a mais comumente encontrada em microrganismos. Outra via frequentemente encontrada em microrganismos é a do ácido indolpirúvico (IPA) (MANULIS et al., 1998; SUZUKI et al., 2003; POLLMANN et al., 2006; SPAEPEN et al., 2007).

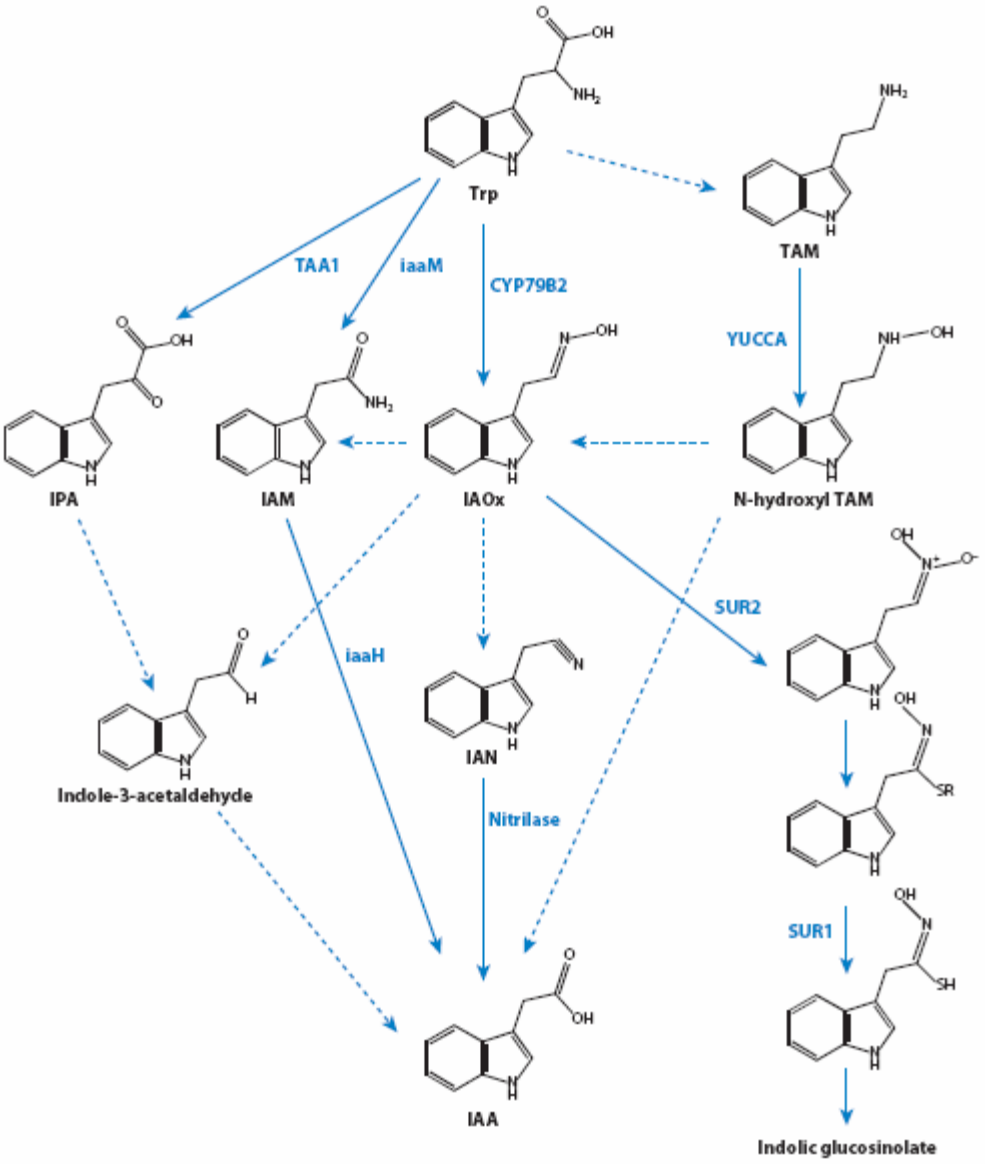

Figura 4. Vias dependentes do triptofano para síntese de auxina que podem ser encontradas em plantas e microrganismos. As setas pontilhadas indicam etapas em que os genes ainda não foram identificados (ZHAO, 2010).

1.7. Transformação genética em bactérias

As possibilidades de estudo sobre genoma funcional de fitopatógenos têm sido ampliadas devido ao completo sequenciamento do genoma de diversas bactérias fitopatogênicas, incluindo *X. axonopodis* pv. citri (DA SILVA et al., 2002). Além disso, a aplicação de técnicas de mutagênese que permitam a descoberta de novos genes envolvidos no processo de patogenicidade é de grande importância no estudo de fitopatógenos. Com

aplicação da técnica de inserção aleatória de transposons, existe a possibilidade de identificação de sequências que podem regular a expressão de genes, além de genes que codificam para hormônios que podem interferir no processo de colonização da planta, como a auxina. A geração de mutantes por meio de recombinação homóloga (MONTEIRO et al., 2001; GAURIVAUD et al., 2002; CASTAÑEDA et al., 2005) e mutagênese aleatória empregando transposon (GUILHABERT et al., 2001), possibilitando a geração de vasto número de mutantes, pode fornecer informações importantes a respeito da patogenicidade de *X. axonopodis* pv. citri.

A principal forma de se iniciar o estudo da função de um gene é através do seu desligamento, isto é, por meio da geração de um mutante. Considerando-se que não ocorrerá a sua expressão no organismo, é possível avaliar-se, ao menos parcialmente, o fenótipo do mutante e o efeito na sua capacidade de infecção da planta.

Nas bactérias, a técnica mais utilizada para a mutação de genes específicos é realizada por meio da troca, por recombinação homóloga, da cópia selvagem do gene alvo por uma cópia truncada ou contendo alguma mutação. Os dois principais métodos empregados para a disrupção gênica por recombinação homóloga são a mutagênese por inserção/deleção ("IDM" do inglês Insertion-Duplication Mutagenesis) e a troca alélica ("AE" do inglês Alelic Exchange). A IDM tem sido empregada com sucesso em diversas espécies como *Mycobacterium smegmatis* (BAUKLARD et al., 1996), *Neisseria gonorrhoeae* (HAMILTON et al., 2001), *Streptococcus pneumoniae* (LEE et al., 1989) e *X. fastidiosa* (NETO et al., 2001; GAURIVAUD et al., 2002). A IDM consiste na recombinação homóloga com uma troca entre o gene selvagem no cromossomo da bactéria e uma cópia truncada desse gene, clonada em um plasmídeo replicativo ou suicida. Após a troca se concretizar, todo o plasmídeo fica inserido no cromossomo bacteriano e o gene alvo sofre uma duplicação (BAPTISTA, 2006).

Sendo assim, a transformação passou a ser a maneira mais simples de se conseguir mutantes de diversas bactérias, sendo que a célula receptora adquire genes de moléculas de DNA solúveis no meio. Para a realização desta técnica, o DNA é extraído de uma suspensão de bactérias doadoras e então é adicionado a uma cultura de células receptoras. Entretanto, não são todas as espécies bacterianas que podem ser transformadas, e mesmo as que podem, necessitam estar em estado de crescimento receptivo para incorporar o DNA doador, ou seja, devem ser competentes. Esta condição geralmente ocorre quando as bactérias receptoras estão na fase logarítmica tardia do seu crescimento. As células bacterianas competentes produzem

uma proteína especial que liga os fragmentos de DNA doador em sítios específicos na superfície celular (PELCZAR et al., 1996).

Técnicas de transformação comum, que simplesmente adiciona o DNA às células receptoras podem ser empregadas com sucesso quando se quer transferir DNA cromossômico para as células receptoras competentes, no entanto, o DNA plasmidial não é facilmente transferido por processos de transformação comum. Para isso, são utilizadas técnicas especiais amplamente utilizadas na engenharia genética que permitem a realização da transformação com DNA plasmidial (PELCZAR et al., 1996). Os dois principais procedimentos utilizados para a realização da transformação são: a eletroporação e o choque térmico. A eletroporação é uma técnica na qual se misturam bactérias e o vetor em um tubo e aplica-se um choque elétrico na mistura, com o objetivo de desestabilizar a membrana e permitir a entrada do vetor na bactéria. Após o choque, a mistura é rapidamente transferida para meio de cultura e incubada a temperatura ideal para que a bactéria possa se recuperar do choque (BRASILEIRO et al., 1998). A transformação com choque térmico associada ao cloreto de cálcio tem o mesmo objetivo. As bactérias e o vetor são misturados com uma solução de cloreto de cálcio e sofrem um choque térmico. Os íons cálcio possuem a função de neutralizar as cargas negativas do DNA e da membrana bacteriana, facilitando a passagem do vetor pela membrana no momento do choque térmico (BRASILEIRO et al., 1998).

Após a transformação, as bactérias são levadas à incubação em condições apropriadas para permitir a sua multiplicação e, em seguida, plaqueadas em meio sólido, para permitir o isolamento de colônias. A identificação das colônias recombinantes é realizada utilizando as características atribuídas pelos plasmídeos. Sendo identificada a bactéria que apresenta a construção de interesse dentre aquelas plaqueadas, faz-se a transferência da colônia para meio líquido para que se possa obter milhões de cópias da bactéria e, consequentemente, da construção (BRASILEIRO et al., 1998).

1.8. Considerações sobre o genoma de *X. axonopodis* pv. citri

Durante o processo de sequenciamento, foram identificados quase 5 mil genes no cromossomo circular de *X. axonopodis* pv. citri (DA SILVA et al., 2002), sendo que destes, cerca de 300 sequências apresentam, por homologia com outros organismos, potencial para contribuírem diretamente com o processo de formação do cancro (BAPTISTA, 2006). Sem

dúvida, a utilidade de estudo de genomas sequenciados está na possibilidade de avaliação experimental da relevância de determinados genes no processo fitopatológico (VINATZER e YAN, 2008).

Dentre os genes que foram encontrados no genoma da bactéria *X. axonopodis* pv. citri, estão aqueles classicamente associados ao processo infeccioso, como os que codificam para o sistema de secreção do tipo III e o efetor *pth*A, além de várias ilhas de patogenicidade (AMARAL et al., 2008). Ainda, foram identificados genes que são claramente envolvidos com virulência em outras bactérias fitopatogênicas e que também desempenham papel relevante na capacidade de colonização de *X. axonopodis* pv. citri (BAPTISTA et al., 2009).

Por outro lado, uma série de sequências apresenta características que permitem identificá-las como "genes", tais como a presença de códons de início e terminação de tradução e comprimento nucleotídico razoável, mas no entanto não apresentam qualquer função atribuída em outros organismos e, por isso, são denominadas "genes hipotéticos conservados". Além disso, há também aquelas seqüências que apresentam tais características e sequer apresentam similaridade com sequências de outros organismos, enfim, podem ser exclusivas de *X. axonopodis* pv. citri. Tais genes também apresentam enorme potencial interessante de investigação, pois podem representar novas e exclusivas estratégias para o organismo.

A categoria de ORFs que codificam para produtos desconhecidos em bactérias perfaz, sem sombra de dúvidas, uma das classes mais numerosas de ORFs, onde se supõe encontrar uma vasta quantidade de informações referentes a adaptação e até mesmo a patogenicidade, em se tratando de microrganismos causadores de doenças (MARTINS, 2009). Existem atualmente mais de 1000 espécies bacterianas com seus genomas disponíveis em bancos de dados mundiais e o número de proteínas hipotéticas a serem caracterizadas é crescente. Bactérias possuem genomas compactos e apresentam normalmente redução ou perda de regiões codificadoras seguindo-se adaptação a nichos restritos (OCHMAN e DAVALOS, 2006).

Diversas bactérias apresentam a possibilidade de codificar para o fitohormônio auxina (AIA, ácido indolacético) (BRANDL e LINDOW, 1998; SERGEEVA et al., 2002). Em bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Erwinia*, já foram identificados efeitos da produção endógena de AIA na virulência destas bactérias (YANG et al., 2007).

Mais recentemente, evidências têm demonstrado o papel do AIA durante o processo infeccioso de fitopatógenos, como a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. tomato, que parece modular a produção de auxina da planta hospedeira através da ação de proteína efetora secretada pelo sistema de secreção do tipo III (CHEN et al., 2007).

Entretanto, ao contrário de alguns outros organismos que demonstram a influência de genes codificadores de hormônios vegetais, em *X. axonopodis* pv. citri não foi identificado ainda qual(is) gene(s) pode(m) estar envolvido(s) neste sistema, embora haja a possibilidade da bactéria efetivamente produzir o hormônio (FETT et al., 1987; COSTACURTA et al. 1998).

Tal estudo seria particularmente interessante para o entendimento do patossistema cancro cítrico, já que a principal via de acesso da bactéria ao hospedeiro é, justamente, uma estrutura que pode ser influenciada por compostos de natureza hormonal, ou seja, o estômato. Um possível mecanismo pelo qual a coronatina, composto possivelmente análogo a fitohormônios e que está presente em *P. syringae* pv. tomato, pode agir promovendo o desenvolvimento de sintomas de doença na planta hospedeira é através do estímulo à síntese de AIA (BROOKS et al., 2005).

Pode-se supor que a bactéria causadora do cancro cítrico apresente, entre seus genes, sequências codificadoras para substâncias que mimetizam produtos que provoquem alterações estomáticas na planta hospedeira e, assim, facilitarem, de alguma forma, a penetração no tecido foliar.

O objetivo deste trabalho foi propor metodologia de identificação de gene(s) envolvido(s) em processo de natureza hormonal através de construção de coleção de mutantes genéticos aleatórios e dirigidos da bactéria *X. axonopodis* pv. citri e avaliação sistemática deste conjunto de linhagens bacterianas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a identificação do(s) gene(s) envolvido(s) com a produção de ácido indolacético (AIA) ou composto com propriedades semelhantes em *X. axonopodis* pv. citri, estratégias baseadas na produção de biblioteca de mutantes dirigidos e aleatórios da bactéria foram desenvolvidas, com determinação de melhores condições artificiais (meio de cultivo) para expressão de genes envolvidos na produção do composto, seguida de seleção sistemática e rápida em placa para linhagem defectiva.

2.1. Seleção de meio de cultivo para expressão de composto hormonal

Para avaliar a síntese de AIA ou composto semelhante pela bactéria, foram testados diversos meios de cultura suplementados com diferentes concentrações de triptofano, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Meios de cultura e concentrações de triptofano avaliados na produção de AIA por *X. axonopodis* pv. citri

Meio de cultura	Concentrações de triptofano (mM)
NYG NB (DIFCO, 1984) Ágar nutriente (DIFCO, 1984) MPI (SOW e DEMAIN, 1979) XVM2 (WENGELNIK et al., 1996)	0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0

Adicionalmente, extrato de folhas de laranja doce foi preparado e adicionado aos meios de cultura, para testar a sua relevância na biossíntese de AIA pela bactéria. O extrato de folhas foi preparado com 4g de folhas, lavadas, cortadas em fragmentos de aproximadamente $1mm^2$ e adicionadas em frasco contendo 40mL de meio MPI [(20 g sacarose, 5 g KH_2PO_4, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g $(NH_4)SO_4$, 2 g ácido cítrico, 6 mg H_3BO_3, 2,4 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, pH 7)] o qual foi levado a um agitador orbital durante 2 horas à 28°C. Após este período, o meio foi retirado do agitador orbital e filtrado por membrana Millipore estéril de 0,22μm, para adição aos meios de cultivo na concentração de 26 mL/L (COSTACURTA, et al., 1998).

Com auxilio de transferidor metálico, colônias de *X. axonopodis* pv. citri foram removidas de placas de cultura permanente e inoculadas em placas de Petri contendo os diversos meios e suas respectivas concentrações de triptofano, cobertas com membrana de nylon e mantidas à temperatura de 28°C por 4 dias. Em seguida, a membrana foi removida e tratada com reagente Salkowski [2% (wt/vol) 0,5 M $FeCl_3$ em 35% ácido perclórico] (GORDON e WEBER, 1951; GLICKMANN e DESSAUX, 1995; COSTACURTA, et al., 1998) por 15 minutos, em temperatura ambiente. A produção de AIA foi identificada pela presença de círculo (halo) vermelho na membrana, na região que originalmente representa o local da deposição da colônia.

2.2. Detecção de AIA com reagente de Salkowski

Para observar a produção de AIA pela bactéria, uma porção de *X. axonopodis* pv. citri isolado 306 (DA SILVA et al., 2002) foi inoculada em frascos de 250mL contendo 50mL de meio MPI suplementado com 5mM de triptofano. Os experimentos foram realizados em duplicata e os frascos foram mantidos em agitador (140 rpm) à 28ºC pelos períodos de 2, 4, 6 e 8 dias. Em seguida, foram centrifugados à 4000 x*g*, por 10 min. Após a centrifugação, uma alíquota do sobrenadante foi misturada com reagente de Salkowski em uma razão de 1:4 (COSTACURTA et al., 1998). A quantificação de AIA foi medida à 530nm (ZIMMER et al., 1991) e comparada com valores obtidos em curva padrão de AIA pura. Esta curva foi obtida pela adição de alíquotas do hormônio no mesmo meio de cultura utilizado no crescimento da bactéria (COSTACURTA et al., 1998).

2.3. Produção de mutantes funcionais

Para a produção de mutantes funcionais através da mutagênese aleatória, células competentes foram preparadas, para a qual uma porção de *X. axonopodis* pv. citri isolado 306 (DA SILVA et al., 2002) foi coletada com alça de platina a partir de cultura permanente (preservada em glicerol à –70^{o}C) e plaqueada em meio NYG (0,5% peptona, 0,3% extrato de levedura, 2% glicerol, 1,8% ágar), sem adição de antibióticos. As placas foram incubadas durante 48 horas à 28^{o}C. Colônias foram raspadas e transferidas para tubo de 500 mL contendo 200 mL de meio NB (0,5% peptona, 0,3% extrato de carne, 0,2% K_2HPO_4, 0,05%

KH_2PO_4) para crescimento sob agitação (140 rpm) à 28°C durante aproximadamente 4 horas. Após o crescimento no meio líquido até $O.D._{600}$ = 0,6 [~ 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL], que corresponde à fase *midlog* de crescimento, as células foram mantidas em gelo por aproximadamente 1 hora. As células foram, então, coletadas e lavadas por centrifugação (4000 x*g*), por 10 min, à 4°C com ressuspensões em 1 e 0,5 volumes de glicerol à 10 % estéril e resfriado. A última lavagem foi realizada pela adição de 1 mL de glicerol à 10 % estéril e resfriado e centrifugação à 13000 x*g*, durante 2 minutos à 4°C. O sobrenadante foi parcialmente removido para permitir apenas a ressuspensão do precipitado em uma concentração final de aproximadamente 4 x 10^{10} UFC/mL. Finalmente, as células competentes foram mantidas no gelo até a transformação (1-2 horas) (AMARAL et al., 2005).

A coleção de mutantes foi obtida a partir de inserção aleatória de *transposon,* pela adição de 1 µL do transposoma EZ::TN <Kan-2>Tnp (Epicentre Technologies, Madison, Wis.) em 40 µL de células competentes, e então transferidas para cuvetas de eletroporação estéreis e previamente resfriadas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.), com "gap" de 2 mm. Um pulso único de alta voltagem (12,5 $kV.cm^{-1}$) foi aplicado à solução à 50 Ω de resistência e 50 µF de capacitância (AMARAL et al., 2005). Imediatamente após o pulso elétrico, 1 mL de meio NYG foi adicionado às células e a suspensão foi incubada em agitador orbital (140 rpm), à 28 ºC por 1 hora, antes do plaqueamento em meio NYG contendo Kanamicina à 50 µg/mL, para seleção de transformantes resistentes ao antibiótico. As placas foram incubadas por 2-3 dias à 28°C para permitir a formação de colônias. Os mutantes foram transferidos, com auxílio de palito, para placas de Petri contendo meio NYG, crescidos à 28°C por 24 horas, para aumento de volume de colônia, e transferidos para placa de cultura permanente contendo 160 µL de meio líquido NYG e glicerol à 15% por poço. As placas foram, em seguida, acondicionadas em *freezer* de ultra-resfriamento (-80°C) e utilizadas para o plaqueamento em escala para os ensaios.

2.4. Seleção *in vitro* para mutantes na produção de AIA

A produção de AIA foi determinada qualitativamente e de acordo com os protocolos de Bric et al. (1991) e Mendes et al. (2007). Colônias da bactéria foram inoculadas em placas contendo o meio XVM2 [20 mM NaCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0.16 mM KH_2PO_4, 0.32 mM K_2HPO_4, 0.01 mM $FeSO_4$, 0.03% *Casamino acids*; pH 6.7] com

adição de triptofano (5 mM), cobertas com membrana de nylon e incubadas durante 4 dias à 28°C. Em seguida, a membrana foi removida e tratada com reagente Salkowski por 15 minutos, em temperatura ambiente. A produção de AIA foi identificada pela presença de círculo vermelho na membrana, na região que originalmente representa o local da deposição da colônia (Figura 5).

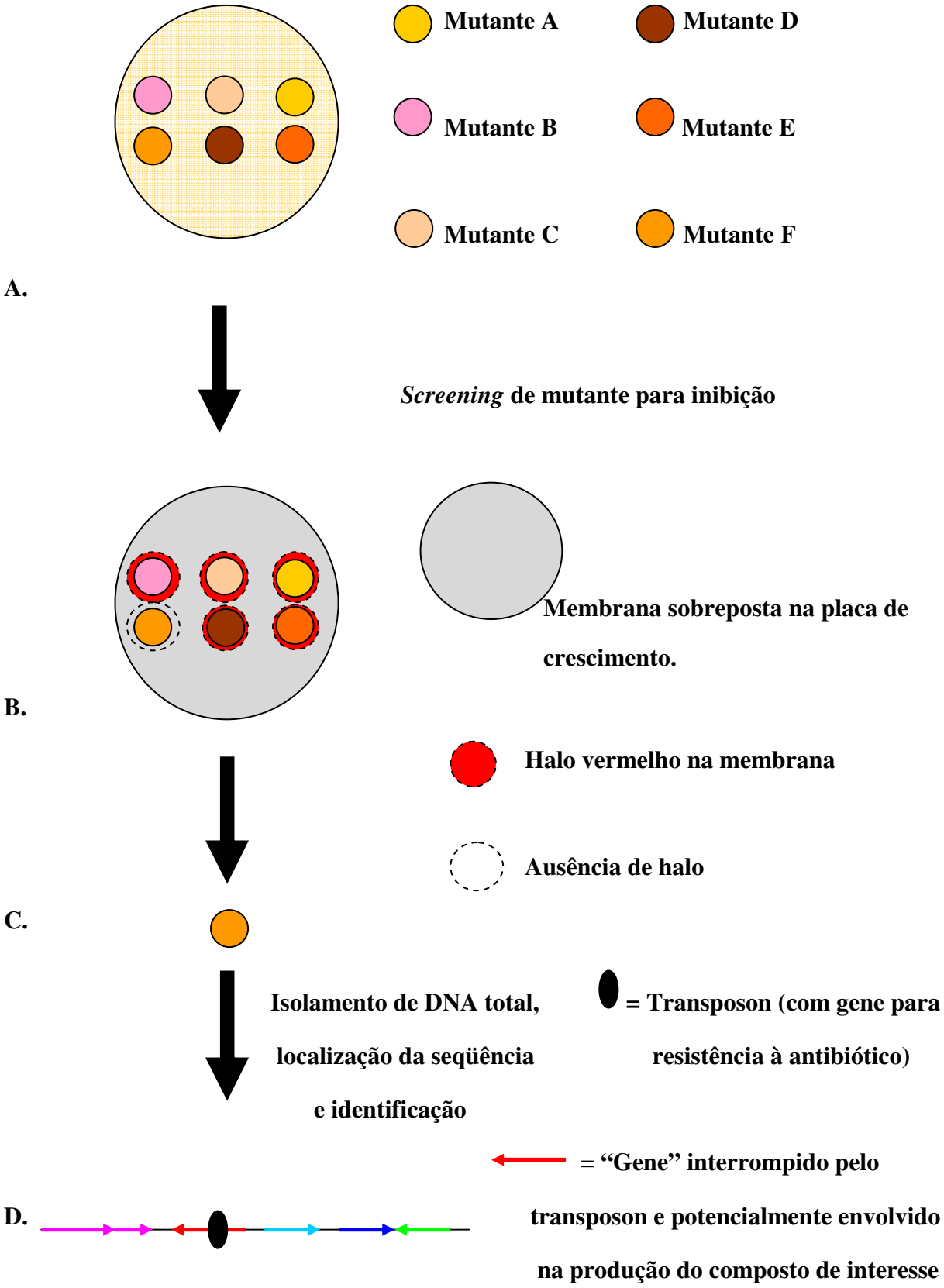

Figura 5. Esquema de seleção em *Xac in vitro*, e após mutagênese genética, para gene envolvido em atividade hormonal.

2.5. Mutagênese dirigida

Foram produzidos mutantes dirigidos da bactéria *X. axonopodis* pv. citri. Oligonucleotídeos foram desenvolvidos para amplificar segmentos de sequências (Tabela 2) que, durante o processo de anotação do genoma completo da bactéria e comparação (BlastP) entre sequências presentes no banco de genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI), apresentaram homologia com genes que codificam proteínas associadas à produção de auxina em outros organismos.

Tabela 2. Genes candidatos à produção de auxina em outros organismos e presentes em *X. axonopodis* pv. citri

Gene	Codigo em Xac	Anotação	Sequência (5´-3´)
trpC	XAC0481	*indole-3-glycerol-phosphate synthase*	F - GCTCACCGATGTGGATTTCT R - CATGGCAAGACCCGATAGAT
iorA	XAC0189	*indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase*	F - ATCGGTTGCCACTACATGGT R - AGCCGCTATGGAAATACGTG
uahA	XAC4327	*allophanate hydrolase*	F - GGACTTGCCCAACAACTGAT R - CGAACTGGTCAAGGTTGGTC
gatAX	XAC1002	Amidase	F - GATTATCTCGCCCACCTGAA R - TTGCAGATACGCATTCAAGC
nthA	XAC2849	Nitrilase	F- CAACGTTCGACACGCATATT R- GGCCAATATCCAGCAGAAAA

Basicamente, os critérios para desenho dos oligonucleotídeos para clonagem das sequências (para obtenção de sequências truncadas) foram: a amplificação de segmento das sequências com mínimo de 100 pares de bases (pb) internamente aos terminais amina e carboxil (ou seja, exclusão do possível códon de iniciação de tradução), temperatura de anelamento de aproximadamente 55°C, comprimento de oligonucleotídeo entre 18 e 25 nucleotídeos, conteúdo de GC entre 40-60%, menos de três nucleotídeos G ou C na extremidade 3' do oligonucleotídeo, ausência de auto-complementariedade e geração de fragmentos de 300 à 600 pb. Basicamente, os parâmetros de amplificação de cada sequência foram (em cada reação de 50 µL): 10-30 ng de DNA genômico, 1 X tampão de amplificação,

0,1-1 µM de cada oligonucleotídeo, 1-4 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de *mix* de dNTP e 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies). As amplificações foram realizadas em 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg., com extensão final de 65°C por 30 seg. e 72°C por 2 min. Tais parâmetros foram alterados conforme a necessidade para cada sequência. Após a corrida do produto da amplificação em gel de agarose à 0,8 %, os fragmentos foram extraídos e purificados com o kit "QIAquick Gel Extraction" (Cat. 28706, QIAGEN).

A construção dos vetores portando as sequências foi realizada em plasmídeo que não apresenta replicação em *X. axonopodis* pv. citri. Para tal, foi utilizado o plasmídeo pCR2.1-TOPO (Invitrogen Life Technologies), que possui como principais características, comprimento de 3,9 kb, genes para resistência à kanamicina e à ampicilina e gene repórter (LacZ). Entre 0,5 à 4 uL do fragmento amplificado e purificado foram adicionados à solução contendo 1 uL de solução salina diluída, completados para 5 uL, e finalmente 1 uL do vetor. O volume final foi submetido à temperatura ambiente (~22°C) por 5 minutos. Em seguida, a reação foi colocada no gelo e uma alíquota de 2 uL foi misturada à aproximadamente 40 uL de células competentes de *E. coli*, para transformação por eletroporação, plaqueamento e seleção.

O plasmídeo resultante foi introduzido em *E. coli* por eletroporação e selecionado em placa com meio LB (0,1% triptona, 0,05% extrato de levedura, 0,1% NaCl, 1,8% agar, pH 7) contendo kanamicina à 50 ug/mL em temperatura de 37ºC durante uma noite. Após confirmação por tamanho de banda, através de PCR com oligonucleotídeos que flanqueiem uma extremidade do gene *nptII* (que confere resistência a Kanamicina) e parte da seqüência interrompida, o clone recombinante foi purificado e utilizado na mutagênese de *X. axonopodis* pv. citri utilizando o mesmo processo de transformação utilizado para mutagênese aleatória.

3. RESULTADOS

3.1. Seleção de meio de cultivo para expressão de composto hormonal

Durante a etapa de seleção de meio de cultivo para síntese de AIA pela bactéria, apenas os meios MPI e XVM2 apresentaram resultado positivo para coloração com o reagente de Salkowski. Os resultados mais expressivos com estes meios foram obtidos nas concentrações de triptofano de 5,0mM e 10mM. Na concentração 2,5mM de triptofano no meio de cultivo, foi observada a coloração vermelha clara, com ausência de coloração nas concentrações de 0,0mM e 15mM, indicando que possivelmente o hormônio não foi produzido (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado da coloração dos meios de cultivo MPI e XVM2 inoculados com *X. axonopodis* pv. citri e suplementados com diferentes concentrações de triptofano

Meios de cultura	Concentração de triptofano (mM)	Coloração obtida
MPI e XVM2	0,0	ausência de coloração
	2,5	vermelho claro
	5,0	vermelho escuro
	10,0	vermelho escuro
	15,0	ausência de coloração

A suplementação com o extrato de folhas nos meios de cultivo MPI e XVM2 permitiu visualizar coloração sob as concentrações de triptofano de 2,5mM e 5,0mM, entretanto não se obteve qualquer coloração com os meios suplementados com concentrações de 10mM e 15mM. Também não foi obtido resultado positivo para AIA quando não foi adicionado o aminoácido triptofano nestes meios de cultivo (Tabela 4). Nos demais meios de cultivo (NYG, NB e agar nutriente), não foi observada coloração para AIA com a suplementação com o extrato de folhas.

Tabela 4. Resultado da coloração dos meios de cultivo MPI e XVM2 inoculados com *X. axonopodis* pv. citri, suplementados com diferentes concentrações de triptofano e com extrato de folhas de laranja doce

Meios de cultura	Concentração de triptofano (mM)	Coloração obtida
MPI e XVM2 + Extrato de folhas	0,0	ausência de coloração
	2,5	vermelho escuro
	5,0	vermelho escuro
	10,0	ausência de coloração
	15,0	ausência de coloração

3.2. Produção e seleção de mutantes funcionais a partir de coleção de linhagens com modificações genéticas aleatórias

Uma biblioteca de 14208 mutantes de *X. axonopodis* pv. citri foi produzida e acondicionada em *freezer* de ultra-resfriamento (-80°C), para posterior plaqueamento em escala (*screening*) para os ensaios. A Figura 6 mostra a disposição de colônias de *X. axonopodis* pv. citri crescidas em placa contendo o meio NYG após serem transferidas de placa de cultura permanente com o auxílio de repicador. Admitindo que o transposon é aleatoriamente distribuído ao longo do genoma e que a transposição é única, pode-se calcular a probabilidade de um gene sofrer mutação usando a seguinte fórmula:

$$P = 1 - (1 - X/G)^n$$

Onde "P" é a probabilidade de encontrar o transposon inserido em um determinado gene; "X" é o comprimento do gene (em kb); "G" é o comprimento do genoma (kb); e "n" é o número de insertos presentes na população (KRYSAN et al., 1999; SUN et al., 2003).

Considerando que o comprimento de um gene em *X. axonopodis* pv. citri é de 1kb em média e que o tamanho do genoma é de 5274kb, a probabilidade de encontrar o transposon inserido em um determinado gene em uma coleção de 14208 mutantes é de aproximadamente 94%. Os clones foram testados para a produção de auxina com o reagente Salkowski, o qual reage com o hormônio produzindo cor vermelha, como mostra a Figura 7.

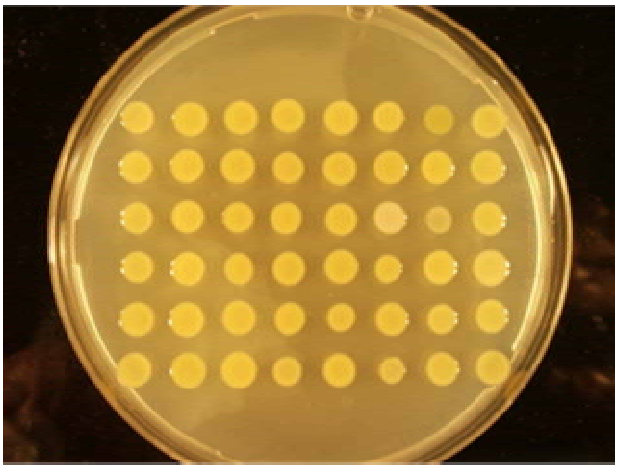

Figura 6. Placa de Petri com disposição organizada de colônias de *X. axonopodis* pv. citri após transferência de placas de cultura permanente e crescimento à 28ºC.

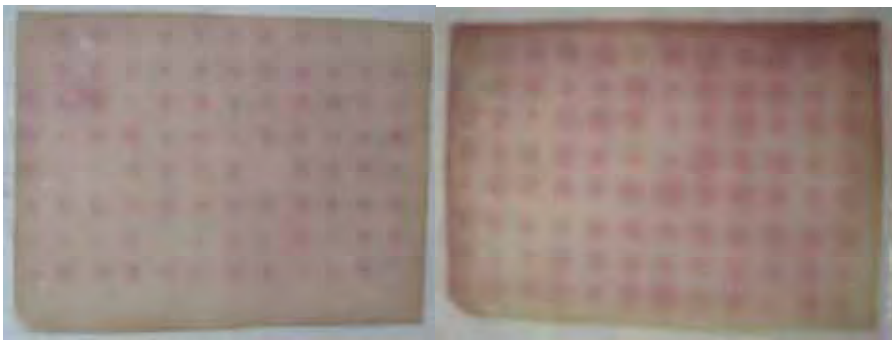

Figura 7. Aspecto de membranas de nylon após o tratamento com o reagente Salkowski. Os círculos vermelhos indicam os locais onde originalmente houve a deposição das colônias que produziram o hormônio AIA. Falhas na membrana, neste caso, indicam ausência de crescimento de mutantes.

Após os testes com as 148 placas de cultura permanente da coleção de mutantes aleatórios, totalizando 14208 mutantes, não foi identificado mutante defectivo para a produção de AIA.

3.3. Detecção de composto com reagente de Salkowski

Utilizando o reagente de Salkowski, o composto que produziu a coloração vermelha foi detectado já no segundo dia após a inoculação no meio de cultura. Observa-se que a produção de tal composto aumenta ao longo do tempo e vai se acumulando no meio. Após o

sexto dia, pode-se notar que a taxa de crescimento bacteriano diminui, contudo, a quantidade de hormônio produzido continua aumentando (Figura 8).

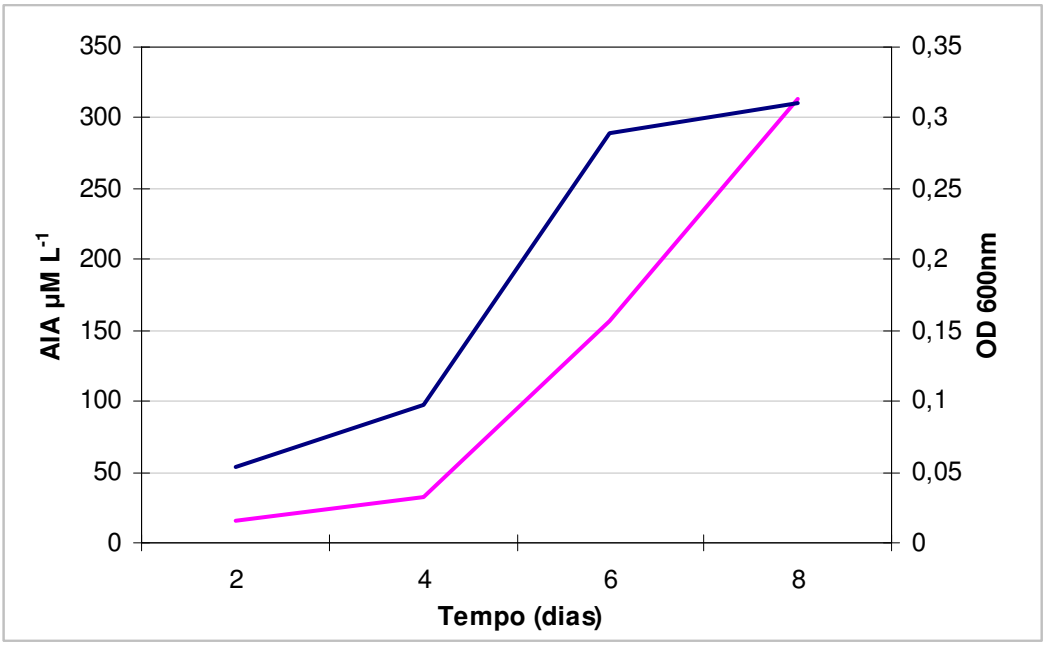

Figura 8. Produção de AIA (em rosa) e crescimento bacteriano (em azul) por *X. axonopodis* pv. citri isolado 306 em 50mL de meio MPI suplementado com 5mM de triptofano.

3.4. Mutagênese dirigida

Dos cinco genes candidatos à produção de AIA previamente selecionados para mutação dirigida, foram obtidos mutantes de apenas três, como mostra a tabela 5.

Tabela 5. Genes candidatos à produção de AIA

Gene	Anotação	Mutantes
trpC	*indole-3-glycerol-phosphate synthase*	+
iorA	*indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase*	+
uahA	*allophanate hydrolase*	+
gatAX	Amidase	-
nthA	Nitrilase	-

(+) genes dos quais foram obtidos mutantes e (-) genes dos quais não foram obtidos mutantes.

Os mutantes obtidos por meio de mutação dirigida foram testados com o reagente de Salkowski, o qual reage com o hormônio produzindo cor vermelha, como mostra a figura 9.

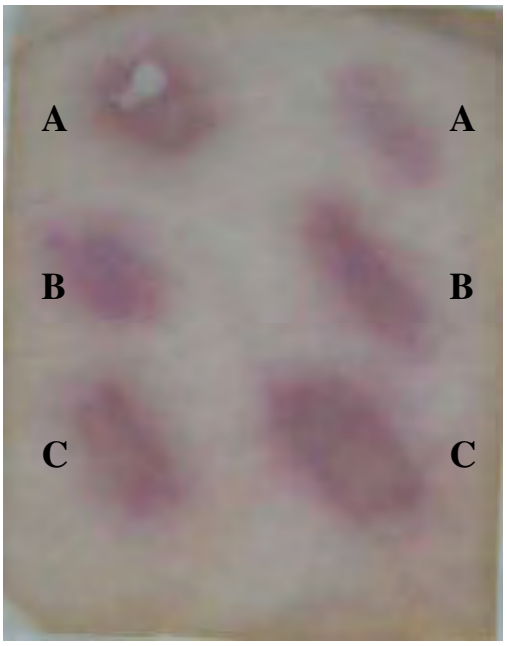

Figura 9. Aspecto da membrana de nylon após o tratamento com o reagente de Salkowski. As áreas vermelhas indicam a produção do hormônio pelos mutantes: A: uahA; B: trpC e C: iorA.

Após os testes com o reagente de Salkowski, não foi caracterizado nenhum mutante defectivo na produção de AIA.

4. DISCUSSÃO

Aspecto relevante deste estudo foi a escolha e a adaptação de meio de cultura apropriado para permitir a síntese de AIA, ou composto semelhante, por *X. axonopodis* pv. citri. Embora vários meios de cultivo tenham sido testados durante o trabalho, apenas dois destes meios (MPI e XVM2) permitiram a visualização da produção do composto pela bactéria. Estes dois meios são os que mais se assemelham ao espaço intercelular da planta de citros, pois são compostos basicamente de sais e açúcares (WENGELNIK et al., 1996; ASTUA-MONGE et al., 2005), sugerindo que alguns genes que induzem a síntese de fitohormônios sejam expressos e podem coincidir com o período de colonização da planta, indicando que a síntese do hormônio AIA possa estar envolvida neste processo.

Apesar da bactéria *X. axonopodis* pv. citri possuir os genes para a via completa da biossíntese de triptofano (Figura 10), a adição do aminoácido nos meios de cultivo apresentou efeito significativo na identificação visual de composto para seleção (Tabela 3).

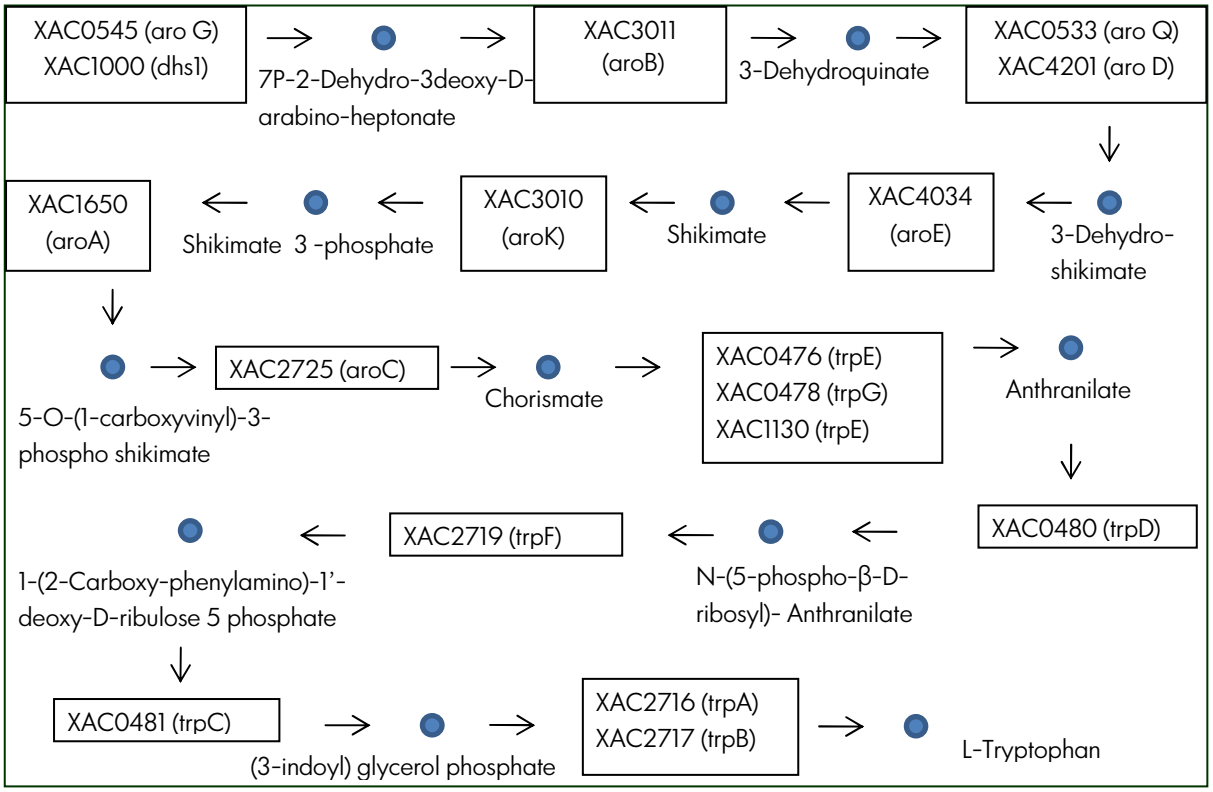

Figura 10. Via completa de biossíntese de triptofano em *X. axonopodis* pv. citri.

A bactéria, entretanto, não possui os genes da via clássica para biossíntese de AIA (Figura 11) no seu genoma, enquanto outras bactérias como *Pseudomonas putida* a possui (PATTEN e GLICK, 2002; ZHAO, 2010) (Figura 12).

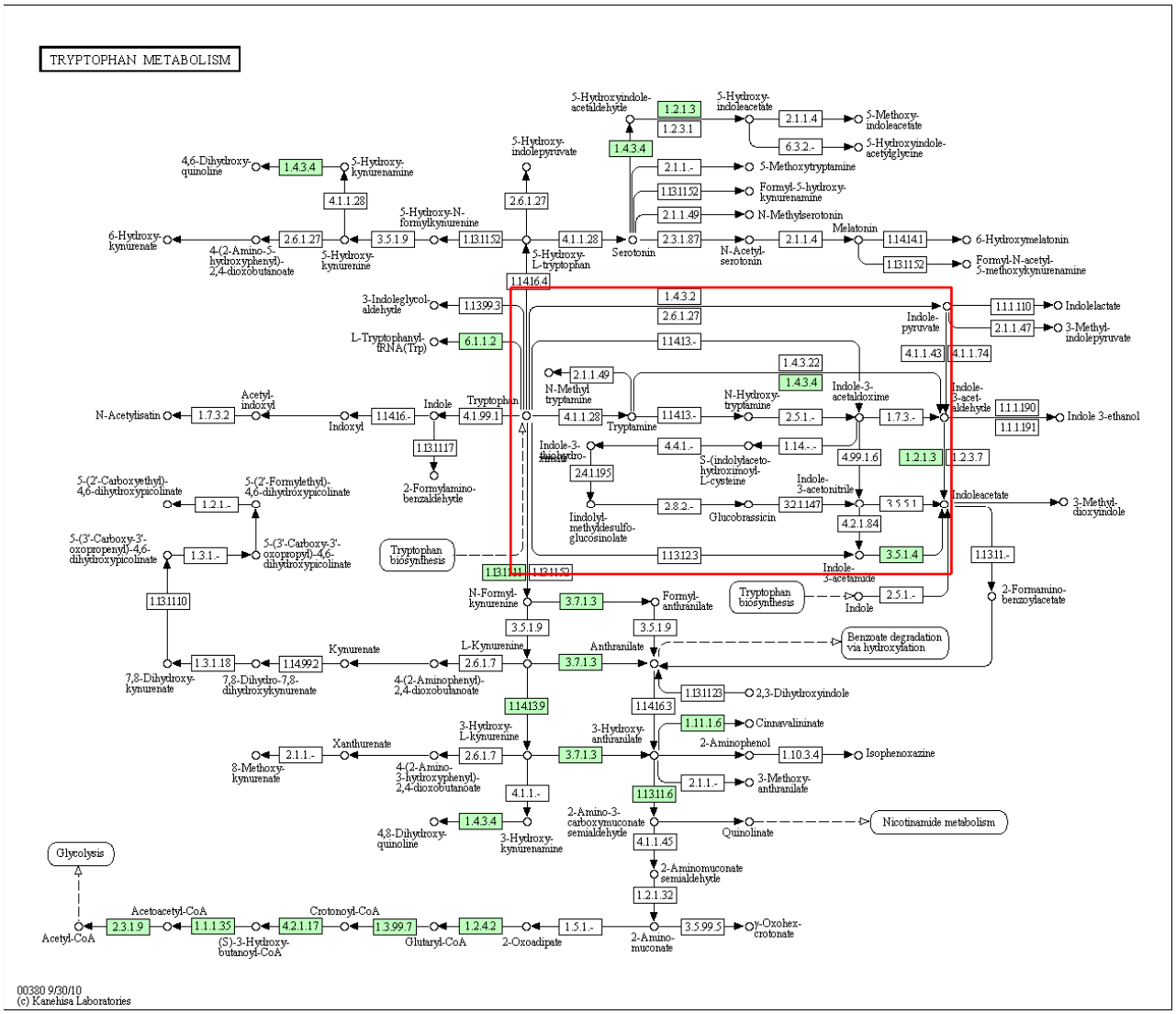

Figura 11. Vias do metabolismo do triptofano e genes identificados em *X. axonopodis* pv. citri. Retângulos com ausência de cor representam genes que não estão presentes em *X. axonopodis* pv. citri enquanto que retângulos coloridos representam genes presentes na bactéria. Pode-se observar que as vias para síntese de AIA (destacado em marrom na Figura) não estão completas, indicando que a bactéria não tem capacidade para biossintetizar o hormônio (Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG, http://www.genome.jp/kegg/).

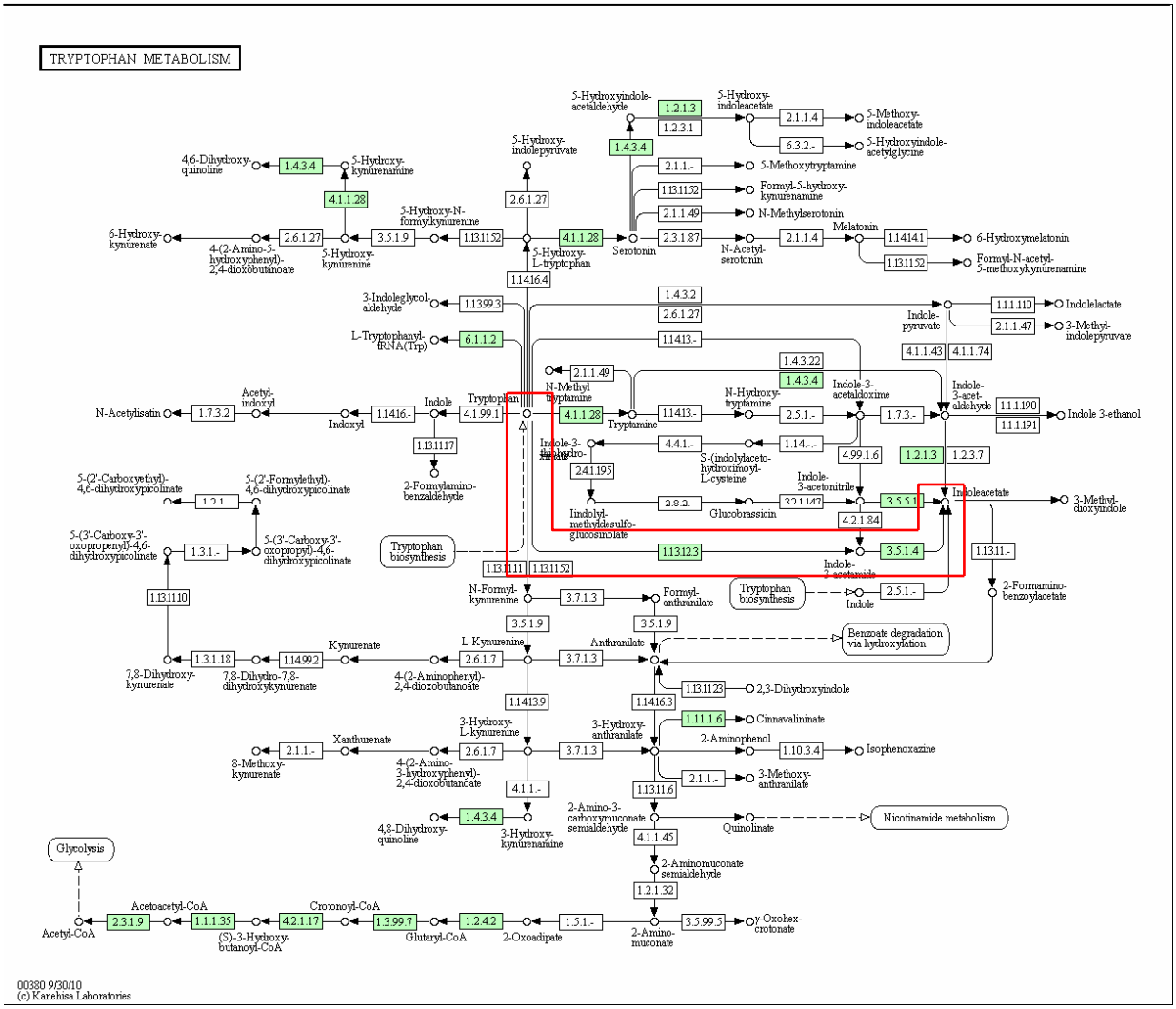

Figura 12. Vias do metabolismo do triptofano e genes identificados em *Pseudomonas putida*. Retângulos com ausência de cor representam genes que não estão presentes em *Pseudomonas putida* enquanto que retângulos coloridos representam genes presentes na bactéria. Pode-se observar que a via da indoleacetamida (IAM) para síntese de AIA (destacado em marrom na figura) está completa, indicando que a bactéria tem capacidade para biossintetizar o hormônio (Fonte: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes – KEGG, http://www.genome.jp/kegg/).

Estudos fisiológicos e de isótopos estáveis estabelecem que o triptofano é o precursor para a biossíntese de AIA em plantas (KAPER e VELDSTRA, 1958; ZIMMER et al., 1991; COSTACURTA et al., 1994; ZHAO, 2010). Além disso, todas as vias definidas para a biossíntese de AIA em microrganismos têm sido até agora triptofano-dependentes (ZHAO, 2010). Isso pode sugerir que a bactéria *X. axonopodis* pv. citri pode ter uma via triptofano-dependente até agora desconhecida para a biossíntese de AIA. Pode-se supor também que a bactéria produza pequenas quantidades do hormônio naturalmente, porém, essa quantidade produzida pode ser insuficiente para ser detectada pelo método de Salkowski. Por outro lado,

ao adicionar triptofano no meio de cultivo, há a hipótese do aminoácido estimular a produção do hormônio, produzindo quantidades que são detectáveis pelo método, pois os experimentos com resposta de *X. axonopodis* pv. citri à coloração só apresentaram expressão positiva para a biossíntese de AIA quando o meio de cultura foi suplementado com o aminoácido. Costacurta et al. (1998) relataram que a adição de triptofano no meio estimula a produção de AIA por *X. axonopodis* pv. citri.

Naturalmente, há uma concentração ótima de triptofano no meio para a bactéria biossintetizar AIA. Essa concentração pode variar entre 5mM e 10mM, sendo que concentrações superiores (15mM) e inferiores (2,5mM e 0,0mM) acabam dificultando a síntese do hormônio. Esses resultados estão de acordo com os relatados por Costacurta et al. (1998), que também observaram que a adição de quantidades elevadas de triptofano dificulta o crescimento em *X. axonopodis* pv. citri, provavelmente devido à toxicidade do aminoácido e a falta deste dificulta a síntese de hormônio pela bactéria.

A adição do extrato de folhas nos meios de cultivo apresentou efeito significativo. O extrato estimulou o crescimento bacteriano e a produção de AIA (Tabela 4). Na presença do extrato, foi possível diminuir a concentração de triptofano adicionado no meio e, mesmo assim, alcançar resultados próximos daqueles alcançados quando o meio era suplementado com maiores concentrações do aminoácido na ausência de extrato. Diversos genes de *Xanthomonas* são induzidos na presença de tecidos de plantas (OSBOURN et al., 1990; SCHULTE e BONAS 1992). Similarmente, compostos presentes no extrato de folhas de laranja doce podem induzir a expressão de genes em *X. axonopodis* pv. citri para biossíntese de AIA, resultando em uma maior produção do hormônio (COSTACURTA et al., 1998).

O reagente Salkowski ainda não havia sido utilizado em *screening* para verificação da biossíntese de auxina em *X. axonopodis* pv. citri em outros laboratórios, entretanto a adaptação deste método que já havia sido utilizado em *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola* (BRIC et al., 1991), entre outros microrganismos, foi um importante avanço alcançado durante a realização deste trabalho. Por outro lado, o reagente Salkowski da maneira como foi utilizado neste trabalho permite apenas avaliação qualitativa da produção de AIA, sendo assim um método limitado, pois não permite comparar a quantidade de hormônio produzido entre os diversos mutantes. Outra limitação de tal método é o fato de que o composto não reage apenas com ácido indolacético produzindo coloração vermelha, podendo

reagir também com outros compostos indol como indolacetamida e ácido indolpirúvico produzindo também cor vermelha (GLICKMANN e DESSAUX, 1995).

Uma hipótese por não ter sido encontrado um mutante defectivo para produção de AIA é o hormônio ser sintetizado por mais de uma via bioquímica em *X. axonopodis* pv. citri, sendo assim, enquanto uma via é paralisada (um gene silenciado) a outra continua sintetizando o composto. A biossíntese de AIA por mais de uma via em um determinado organismo não é incomum. Normanly et al. (1993) relataram a biossíntese de AIA por diferentes vias em *Arabidopsis thaliana*. Além disso, Wright et al. (1991) observaram que AIA pode ser biossintetizada por mais de uma via em planta de milho, inclusive por uma independente de triptofano e Manulis et al. (1998) identificaram mais de uma via para produção de AIA em *Erwinia herbicola.* Ainda, outra hipótese é de que o reagente Salkowski reaja com outros indol compostos em *X. axonopodis* pv. citri, produzidos durante a síntese de AIA, dificultando a verificação de mutantes defectivos para o hormônio.

Cabe ressaltar também que o número de mutantes aleatórios produzidos na coleção em questão pode estar ainda aquém do valor máximo a ser obtido. Sun et al. (2003) testaram fórmula para estimar uma coleção de 17000 mutantes da bactéria *X. campestris,* chegando à probabilidade de 97% de encontrar o transposon inserido em um determinado gene de interesse, sendo que este microrganismo possui genoma com 4182 ORFs e tamanho médio de ORF de 1027pb. Deve-se considerar também que tal fórmula considera que a distribuição dos transposons ao longo do genoma é completamente aleatória, o que pode não ser necessariamente verdadeiro. Ou seja, há a possibilidade da inserção do transposon se concentrar em região do genoma que não comporta o(s) gene(s) de interesse deste estudo (LEE et al., 1987). No presente estudo, para obter-se uma estimativa de 96,6 % de "cobertura" do genoma, seriam necessários aproximadamente 17000 mutantes produzidos, segundo a fórmula sugerida.

A nitrilase é uma família de enzimas capazes de converter a indolacetonitrila (IAN) em ácido indoleacético (NORMANLY et al., 1997; HILLEBRAND et al., 1998; NORMANLY e BARTEL, 1999; LJUNG et al., 2001; PARK et al., 2003; ZHAO, 2010). Esta conversão ocorre por meio da hidrólise de uma nitrila (IAN) à seu ácido carboxílico (AIA) (PARK et al., 2003), sendo uma enzima chave no processo de biossíntese de AIA em plantas. A indolacetonitrila pode ser biossintetizada por meio da indolacetaldoxima (IAOx), porém as enzimas envolvidas nesse processo permanecem desconhecidas (ZHAO, 2010). Ainda, a

indolacetaldoxima pode ser sintetizada a partir do triptofano através de enzimas do citocromo P450, codificadas pelos genes CYP79B2 e CYP79B3 (MIKKELSEN et al., 2000; ZHAO et al., 2002).

Diversos microrganismos, como aqueles dos gêneros *Pseudomonas* e *Agrobacterium*, utilizam a *amidase triptofano-2-monooxigenase* (IaaM) para converter triptofano à indoleacetamida (IAM), a qual é subsequentemente hidrolisada à ácido indoleacético (AIA) pela hidrolase *iaa*H (COMAI e KOSUGE, 1982; CAMILLERI e JOUANIN, 1991; SUZUKI et al., 2003; ZHAO, 2010). No genoma de *X. axonopodis* pv. citri é encontrado uma amidase (*gat*AX), além de uma nitrilase (*nth*A), apresentado-se em material para investigação do possível envolvimento desses genes na síntese de AIA neste organismo. Entretanto, ao se realizar a mutação dirigida para os genes nthA e gatAX não foi recuperado nenhum mutante. Uma das razões para não se recuperar nenhum mutante de tais genes é que eles possivelmente codifiquem composto essencial para a manutenção da vida do organismo, participando como parte do grupo mínimo de genes necessários para sobrevivência da célula (STAHL e STINTZI, 2011).

O gene uahA codifica a enzima *allophanate hydrolase* que, como a enzima *triptofano-2-monooxigenase*, é uma amidase. Por codificar uma amidase, este gene foi escolhido para ser silenciado por meio de mutação dirigida. Porém, ao realizar a mutação, não foram obtidos mutantes defectivos para coloração em placa, o que indica que tal gene não participa no processo de biossíntese deste hormônio em *X. axonopodis* pv. citri.

A indole-3-glycerol-phosphate synthase (IGS) desempenha uma importante função na biossíntese de triptofano e ácido indoleacético, pois é a única enzima conhecida que catalisa a formação do anel indol (OUYANG et al., 2000). Na biossíntese do triptofano, a IGS pode catalisar a formação de índole-3-glycerol-phosphate (IGP) a partir do 1-(O-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphate (CdRP). O IGP formado pode seguir duas vias: formar indol e este formar triptofano, ou então, formar diretamente ácido indoleacético (AIA), constituindo uma via independente do triptofano para biossíntese de AIA (RADWANSKI e LAST, 1995; ÖSTIN et al., 1999; OUYANG et al., 2000; LJUNG et al., 2001). No entanto, ao se realizar a mutação dirigida do gene trpC em *X. axonopodis* pv. citri, o qual é responsável pela biossíntese de IGS, não se obteve mutantes defectivos através da coloração com o reagente de Salkowski, sugerindo que este gene não participa da síntese desse hormônio neste microrganismo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, B. R. e ASSMANN, S. M. Hormone interactions in stomatal function. **Plant Molecular Biology**, v. 69, p. 451-462, 2009.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5, ed., Elsevier Academic Press, 2005.

AMARAL, A. M. do. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado Técnico** 86, ISSN 0102-0099, 2003.

AMARAL, A. M. do; NAKATANI, A. K.; HOMEM, R. A.; BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A. Ilhas de patogenicidade em bactérias fitopatogênicas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 16, p. 207-231, 2008.

AMARAL, A. M. do; TOLEDO, C. P.; BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 336-338, 2005.

ARSHAD, M. e FRANKENBERGER, W. T. Microbial production of plant hormones. **Plant Soil**, v. 133, p. 1–8, 1991.

ASTUA-MONGE, G., J. FREITAS-ASTUA, G. BACOCINA, J. RONCOLETTA, S. A. CARVALHO, AND M. A. MACHADO. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 1201-1205, 2005.

BAPTISTA, J. C. **Análise funcional de genes de degradação de celulose de X*anthomonas axonopodis* pv. citri**. 110p. Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A.; HOMEM, R. A.; TORRES, P. S.; VOJNOV, A.; AMARAL, A. M. do. Mutation in the *xps*D gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, p. 146-153, 2009.

BAUKLARD, A.; KREMER, L.; LOCHT, C. Efficient homologous recombination in fastgrowing and slow-growing mycobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 11, p. 3091-3098, 1996.

BEATTIE, G. A. e LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 145–72, 1995.

BEATTIE, G. A. e LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, p. 353–59, 1999.

BELASQUE JÚNIOR, J. **Dinâmica espacial do cancro cítrico, interação com a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) e diversidade genética do seu agente causal (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri)**. 171p. Tese (Doutorado em Agronomia) – USP/ESALQ, Piracicaba, 2005.

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

BRANDL, M. T. e LINDOW S. E. Contribution of indole-3-acetic acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3256-63, 1998.

BRASILEIRO, A. C. M. e CARNEIRO, V. T. C. Manual de transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 101-103, 1998.

BRIC J. M.; BOSTOCK R. M.; SILVERSTONE S. E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 535-538, 1991.

BROOKS, D. M.; BENDER, C. L.; KUNKEL, B. N. The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, p. 629–639, 2005.

BRUMBLEY, S. M.; PETRASOVITS, L. A.; MURPHY, R. M.; NAGEL, R. J.; CANDY, J. M.; HERMANN, S. R. Establishment of a functional genomics platform for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 175-183, 2004.

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

BUTTNER, D. e BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 107-133, 2010.

CAMILLERI, C. e JOUANIN, L. The TR-DNA region carrying the auxin synthesis genes of the *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid pRiA4: Nucleotide sequence analysis and introduction into tobacco plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, p. 155-162, 1991.

CASTAÑEDA, A.; REDDY, J. D.; EL-YACOUBI, B.; GABRIEL, D. W. Mutagenesis of all eight avr genes in *Xanthomonas campestris* pv. campestris had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 12, p. 1306-1317, 2005.

CHEN, Z.; AGNEW, J. L.; COHEN, J. D.; HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J.; KUNKEL, B. N. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, p. 20131-20136, 2007.

CHO, Y.; DAVIS, J. W.; KIM, K.-H.;WANG, J.; SUN, Q.-H.; CRAMER Jr., R. A.; Jr., LAWRENCE, C. B. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 1, p. 7-15, 2006.

CLARK, E.; MANULIS, S.; OPHIR, Y.; BARASH, I.; GAFNI, Y. Cloning and characterization of iaaM and iaaH from *Erwinia herbicola* pathovar gypsophilae. **Phytopathology,** v. 83, p. 234-240, 1993.

COMAI, L. e KOSUGE, T. Cloning and characterization of iaaM, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. **Journal of Bacteriology**, v. 149, p. 40-46, 1982.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 243, p. 463-472, 1994.

COSTACURTA, A.; MAZZAFERA, P.; ROSATO, Y. B. Indole-3-acetic acid biosynthesis by *Xanthomonas axonopodis* pv. citri is increased in the presence of plant leaf extracts. **FEMS Microbiology Letters**, v. 159, p. 215-220, 1998.

COSTACURTA, A. e VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, p. 1-18, 1995.

DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

DAVIES, F. S. e ALBRIGO, L. G. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994, 254p.

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

DEBROY, S.; THILMONY, R.; KWACK, Y.-B.; NOMURA, K.; HE, S. Y. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. **Proceedings of the National Academy of Science of the U S A**, v. 101, n. 26, p. 9927-9932, 2004.

DE FEYTER, R.; YANG, Y.; GABRIEL, D. W. Gene-for-gene interactions between cotton R genes *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum avr genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 6, p. 225-237, 1993.

DIENELT, M. M. e LAWSON, R. H. Histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. citri from Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia* : Transmission electron microscopy. **Phytopathology**, v. 79, p. 336-348, 1989.

DIFCO MANUAL, 10ed. Detroit: Difco Laboratories, 1984.

DUAN, Y. P.; CASTAÑEDA, A.; ZHAO, G.; ERDOS, G.; GABRIEL, D. W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 6, p. 556-560, 1999.

FETT W. F; OSMAN S. F.; DUNN M. F. Auxin production by plant-pathogenic Pseudomonads and Xanthomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1839-1845, 1987.

GAURIVAUD, P.; SOUZA, L. C. A.; VIRGILIO, A. C. D.; MARIANO, A. G.; PALMA, R. R.; MONTEIRO, P. B. Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4658-4665, 2002.

GLICKMANN, F. e DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 793-796, 1995.

GORDON, S. A. e Weber, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192–195, 1951.

GOTO, M.; KUMAR, J.; CHAUBE, H. S.; SINGH, U. S.; MUKHOPADHYAY, A. N. (Eds.). Citrus canker. In: **Plant diseases of international importance**. Englewood: Prentice-Hall. p. 250-269, 1992.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, 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.

GRUEN, H. W. Auxin and fungi. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 10, p. 405–440, 1959.

GUILHABERT, M. R.; HOFFMAN, L. M.; MILLS, D. A.; KIRKPATRICK, B. C. Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes molecular. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 701–706, 2001.

GUTJAHR, C.; RIEMANN, M.; MÜLLER, A.; DÜCHTING, P.; WEILER, E. W.; NICK, P. Cholodny–Went revisited: a role for jasmonate in gravitropism of rice coleoptiles. **Planta**, v. 222, n. 4, p. 575-585, 2005.

HAMILTON, H. L.; SCHWARTZ, K. J.; DILLARD, J. P. Insertion-duplication mutagenesis of *Neisseria*: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4718-4726, 2001.

HASSE, G. **A laranja no Brasil**. São Paulo: Edição de Duprat & Iobe Propaganda, p. 37-41, 1987.

HILLEBRAND, H.; BARTLING, D.; WEILER, E. W. Structural analysis of the NIT2/NIT1/NIT3 gene cluster encoding nitrilases, enzymes catalyzing the terminal activation step in indole-acetic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 36, p. 89–99, 1998.

HIRANO, S. S. e UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* – a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 624–53, 2000.

IREY, M.; GOTTWALD, T.; GRAHAM, J.; CARLTON, G.; RILEY, T. Post-hurricane analysis of citrus canker spread and progress towards the development of a predictive model for future weather related spread. **In:** International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, 2., Flórida. Crowne Plaza Orlando International, p. 15, 2005.

IRVING, H. R.; GEHRING, C. A.; PARISH, R. W. Change in cytosolic pH and calcium of guard cells precede stomatal movements. **Plant Biology**, v. 89, p. 1790–1794, 1992.

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, n. 9, p. 891–898, 2005.

KANAMORI, H. e TSUYUMU, S. Comparison of nucleotide sequence of canker-forming and non-canker-forming pthA homologues in *Xanthomonas campestris* pv. citri. **Annals of the Phytopathology Society of Japan**, n. 64, p. 462-470, 1998.

KAPER, J. M. e VELDSTRA, H. On the metabolism of tryptophan by *Agrobacterium tumefaciens*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 401–420, 1958.

KRYSAN, P. J.; YOUNG, J. C.; SUSSMAN, M. R. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 11, p. 2283-2290, 1999.

LAKE, J. A.; QUICK, W. P.; BEERLING, D. J.; WOODWARD, F. I. Signals from mature to new leaves. **Nature**, v. 411, p. 154, 2001.

LARANJEIRA, F. F. e PALAZZO, D. A. Danos qualitativos a produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 20, p. 77-91, 1999.

LAWSON, R. H.; DIENELT, M. M.; CIVEROLO, E. L. Histopathology of *Xanthomonas campestris* pv. citri from Florida and Mexico in wound-inoculated detached leaves of *Citrus aurantifolia* : Light and scanning electron microscopy. **Phytopathology**, v. 79, p. 329-335, 1989.

LEE, S. Y.; BUTLER, D.; KLECKNER, N. Efficient TnlO transposition into a DNA insertion hot spot in vivo requires the 5-methyl groups of symmetrically disposed thymines within the hot-spot consensus sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** v. 84, p. 7876-7880, 1987.

LEE, M. S.; SEOK, C.; MORRISON, D. A. Insertion-duplication mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4796-4802, 1989.

LEITE JUNIOR, R. P. Surviving with citrus canker in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v. 2, p. 890-896, 2000.

LIU, H.; ZHANG, S.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-walldegrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 12, p. 1296–1305, 2005.

LJUNG, K.; BHALERAO, R. P.; SANDBERG, G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. **The Plant Journal**, v. 28, p. 465–474, 2001.

LOHSE, G. e HEDRICH, R. Characterization of the plasma-membrane H^+-ATPase from *Vicia faba* guard cells. **Planta**, v. 188, p. 206–214, 1992.

MACCHERONI, W.; ALEGRIA, M. C.; GREGGIO, C. C. et al. Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae family) associated with citrus sudden death disease. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 3028-3037, 2005.

MANULIS, S.; HAVIV-CHESNER, A.; BRANDL, M. T.; LINDOW, S. E.; BARASH, I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. gypsophilae. **Molecular Plant-Microbe Interactions,** v. 11, n. 7, p. 634-642, 1998.

MARTINS, P. M. M. **Localização sub-celular de proteínas marcadas com gfp em X*anthomonas axonopodis* pv. citri por microscopia de fluorescência.** 93p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - UNESP/IB, Rio Claro, 2009.

MATTOS JÚNIOR, D.; NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. **Citros**. Campinas-SP, Instituto Agronômico e Fundag, 929p., 2005.

MAZZOLA, M. e WHITE, F. F. A mutation in the indole-3-acetic acid biosynthesis pathway of *Pseudomonas syringae* pv. syringae affects growth in *Phaseolus vulgaris* and syringomycin production. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1374-1382, 1994.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; HE, S. Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 101-122, 2008.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S. Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v. 126, p. 969–80, 2006.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7259-7267, 2007.

MIKKELSEN, M. D.; HANSEN, C. H.; WITTSTOCK, U.; HALKIER, B. A. Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 33712–33717, 2000.

MINSAVAGE, G. V.; MUDGETT, M. B.; STALL, R. E.; JONES, J. B. Importance of opgH (Xcv) of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria in host-parasite interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 2, p. 152-161, 2004.

MONTEIRO, P. B.; TEIXEIRA, D. C.; PALMA, R. R.; GARNIER, M.; BOVE, J. M.; RENAUDIN, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with *ori*C plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2263-2269, 2001.

MORRIS, R. O. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 509-538, 1986.

NETO, J. F. S.; KOIDE, T.; GOMES, S. L.; MARQUES, M. V. Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, n. 1, p. 105-110, 2001.

NEVES, M. E.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D. S.; NEVES, F. M. Citricultura brasileira: efeitos econômico-financeiros 1996-2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 2, p. 432, 2001.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F.; ROSSI, R. M.; MELO, P. A. Metodologias de análise de cadeias agroindustriais: aplicação para citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 26, p. 468-473, 2004.

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

NOBLE, P. S. **Introduction to biophysical plant physiology**. Freeman; San Francisco: 488p, 1974.

NORMANLY, J. e BARTEL, B. Redundancy as a way of life: IAA metabolism. **Current Opinion in Plant Biology,** v. 2, p. 207–213, 1999.

NORMANLY, J.; COHEN, J. D.; FINK G. R. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 90, p. 10355-59, 1993.

NORMANLY, J.; GRISAFI, P.; FINK, G. R.; BARTEL, B. *Arabidopsis* mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. **Plant Cell,** v. 9, p. 1781–90, 1997.

OCHMAN, H. e DAVALOS, L. M. The nature and dynamics of bacterial genomes. **Science**, Washington, v. 311, n. 5768, p. 1730, 2006.

OKINAKA, Y.; YANG, C. H.; PERNA, N. T.; KEEN, N. T. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 7, p. 619-629, 2002.

OSBOURN, A. E.; CLARKE, B. R.; DANIELS, M. J. Identification and DNA sequence of a pathogenicity gene of *Xanthomonas campestris* pv. campestris. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, p. 280-285, 1990.

ÖSTIN, A.; ILIC, N.; COHEN, J. D. An *in vitro* system from maize seedlings for tryptophan-independent indole-3-acetic acid biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 119, p. 173-178, 1999.

OUYANG, J., SHAO, X.; LI, J. Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana.* **The Plant Journal,** v. 24, n. 3, p. 327-333, 2000.

PARK, W. J.; KRIECHBAUMER, J.; MÜLLER, A.; PIOTROWSKI, M.; MEELEY, R. B.; GIERL, A.; GLAWISCHNIG, E. The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid. **Plant Physiology,** v. 133, p. 794-802, 2003.

PATTEN, C. L. e GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3795–3801, 2002.

PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**: **conceitos e aplicações**, v. 1, 2. ed. São Paulo: MAKRON Books, 334p, 1996.

POLLMANN, S.; MÜLLER, A.; WEILER, E. W. Many roads lead to "auxin": of nitrilases, synthases, and amidases. **Plant Biology**, v. 8, p. 326-333, 2006.

PRUVOST, O.; BOHER, B.; BROCHERIEUX, C.; NICOLE, M.; CHIROLEU, F. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. **Phytopathology**, v. 92, n. 4, p. 336-346, 2002.

RADWANSKI, E. R. e LAST, R. L. Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 921-934, 1995.

RODRIGUES NETO, J. e RIBEIRO, J. G. B. **Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico**. Brasília: MAPA/SDA/ DDIV, 66p, 2002.

ROSSETTI V. V. **Manual ilustrativo de doenças dos citros.** ed. FEALQ/FUNDECITRUS, 207p, 2001.

SAA/SP (Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo). Disponível em: http://www.agroportal.sp.gov.br/, 2008.

SCHUBERT, T. S.; RIZVI, S. A.; SUN, X.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; DIXON, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida—again. **Plant Disease**, v. 85, n. 4, p. 340-356, 2001.

SCHULTE, R. e BONAS, U. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria hrp gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 815-823, 1992.

SERGEEVA E.; LIAIMER A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta,** v. 215, n. 2, p. 229-38, 2002.

SIMPSON, A. J. G.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p. 151-157, 2000.

SNAITH, P. J. e MANSFIELD, T.A. Stomatal sensitivity to abscisic acid. **Plant, Cell & Environment**, v. 5, p. 309–311, 1982.

SOW, P. e DEMAIN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRLL B1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, p. 1186-1192, 1979.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p. 425–448, 2007.

STAHL, M. e STINTZI, A. Identification of essential genes in *C. jejuni* genome highlights hyper-variable plasticity regions. **Functional and Integrative Genomics**, v. 11, n. 2, p. 241-257, 2011.

SUN, Q.; WU, W.; QIAN, W.; HU, J.; FANG, R.; HE, C. High quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae and *X. campestris* pv. campestris generated by an efficient transposon mutagenesis system. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, p. 145–150, 2003.

SUZUKI, S.; HE, Y. X.; OYAIZU, H. Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. **Current Microbiology**, v. 47, p. 138–143, 2003.

SWARUP, S.; de FEYTER, R.; BRLANSKY, R. H.; GABRIEL, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas* citri enables strains from several pathovars to elicit canker-like lesions on citrus. **Phytopathology**, v. 81, 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, p. 204-213, 1992.

THANASSI, J. A.; HARTMAN-NEUMANN, S. L.; DOUGHERTY, T. J.; DOUGHERTY, B. A.; PUCCI, M. J. Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 14, p. 3152-3162, 2002.

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. (eds.). **Compendium of citrus diseases**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 2000, 92p.

VANDENBUSSCHE, F. e VAN DER STRAETEN, D. Shaping the shoot: a circuitry that integrates multiple signals. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 499–506, 2004.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45 p. 472-489, 1995.

VERNIÈRE, C. J.; GOTTWALD, T. R.; PRUVOST, O. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri in various citrus plant tissues. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 832-843, 2003.

VINATZER, B. A. e YAN, S. Mining the genomes of plant pathogenic bacteria: how not to drown in gigabases of sequence. **Molecular Plant Pathology**, v. 9, n. 1, p. 105–118, 2008.

WEINGART, H. e VOLKSCH, B. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars *in vitro* and *in planta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 156-161, 1997.

WENGELNIK, K.; MARIE, C.; RUSSEL, M.; BONAS, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 1061–1069, 1996.

WENT, F. W. e THIEMANN, K. V. **Phytohormones**. MacMillan, New York, 1937.

WHITE, F. F. e ZIEGLER, S. F. Cloning of the genes for indoleacetic acid synthesis from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae.* **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, p. 207-210, 1991.

WOODWARD, F. I. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO_2 concentration from the preindustrial levels. **Nature,** v. 327, p. 617–18, 1987.

WRIGHT, A. D.; SAMPSON, M. B.; NEUFFER, M. G.; MICHALCZUK, L.; SLOVIN, J. P.; COHEN, J. D. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. **Science**, v. 254, p. 998-1000, 1991.

YANG, S.; ZHANG, Q.; GUO, J.; CHARKOWSKI, A. O.; GLICK, B. R.; IBEKWE, A. M.; COOKSEY, D. A.; YANG, C. H. Global effect of indole-3-acetic acid biosynthesis on multiple virulence factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 73, n. 4, p. 1079-88, 2007.

YOUNG, L. e DONG, Q. TAMS technology for simple and efficient in vitro site-directed mutagenesis and mutant screening. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 11-13, 2003.

YUN, M. H.; TORRES, P. S.; EL OIRDI, M.; RIGANO, L. A.; GONZALEZ-LAMOTHE, R.; MARANO, M. R.; CASTAGNARO, A. P.; DANKERT, M. A.; BOUARAB, K.; VOJNOV, A. A. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. **Plant Physiology**, v. 141, n. 1, p. 178-187, 2006.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, p. 49-64, 2010.

ZHAO, Y.; HULL, A, K.; GUPTA, N. R.; GOSS, K. A.; ALONSO, J., et al.. Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. **Genes & Development,** v. 16, p. 3100–12, 2002.

ZIMMER, V.; APARICIO, C.; ELMERICH, C. Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*: identification and sequencing of a TrpGDC cluster. **Molecular and General Genetics**, v. 299, p. 41-51, 1991.