

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**GENES DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO E SUAS
IMPLICAÇÕES NA PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DA**
Xanthomonas citri subsp. *citri*

Julie Anne Espíndola Amorim
Engenheira Agrônoma

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**GENES DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO E SUAS
IMPLICAÇÕES NA PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DA**
Xanthomonas citri subsp. *citri*

Julie Anne Espíndola Amorim

Orientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Coorientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

2018

A524g Amorim, Julie Anne Espíndola
Genes do metabolismo do nitrogênio e suas implicações na patogenicidade e virulência da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* / Julie Anne Espíndola Amorim. -- Jaboticabal, 2018
ix, 82 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Alessandro de Mello Varani
Coorientador: Jesus Aparecido Ferro
Banca examinadora: Daniel Guariz Pinheiro, Fabrício José Jaciani, José Belasque Júnior, Rafael Marini Ferreira
Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. Mutagênese. 3. Sistema regulador de nitrogênio (NTR). 4. Sistema regulador de dois componentes (TCS). 5. Sistema de secreção tipo 3 (SST3). I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.23

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

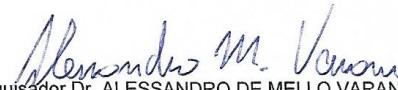
TÍTULO DA TESE: GENES DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO E SUAS IMPLICAÇÕES NA
PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DA *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

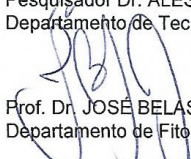
AUTORA: JULIE ANNE ESPÍNDOLA AMORIM

ORIENTADOR: ALESSANDRO DE MELLO VARANI

COORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA
(GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


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


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


Pós-doutorando RAFAEL MARINI FERREIRA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP / Jaboticabal


Pesquisador Dr. FABRICIO JOSÉ JACIANI
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDECITRUS / Araraquara/SP


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

Jaboticabal, 27 de abril de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JULIE ANNE ESPÍNDOLA AMORIM, nascida em 15 de maio de 1989 na cidade de Maceió, Alagoas. Filha de Julio Roberto Araujo de Amorim e Suely França de Espíndola Amorim. Concluiu o ensino médio em dezembro de 2006 no Colégio de Orientação e Estudos Integrados (Coesi), em Aracaju, Sergipe. Em março de 2007, iniciou o curso de Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Sergipe (UFS), em São Cristóvão, Sergipe, obtendo o título de Engenheira Agrônoma em fevereiro de 2012. Em março do mesmo ano, ingressou no curso de mestrado do Programa de Biotecnologia de Recursos Naturais, também na UFS, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Desenvolveu a pesquisa para elaboração da dissertação na Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe, obtendo o título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais, em fevereiro de 2014. Em agosto do mesmo ano, iniciou o doutorado no Programa de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp/FCAV, em Jaboticabal, São Paulo, também como bolsista da CAPES. Durante toda sua vida acadêmica até o presente, a autora direcionou seus estudos para a área de Recursos Genéticos e Biologia Molecular aplicada à agricultura, com a utilização de ferramentas biotecnológicas, tais como: marcadores moleculares, “Polymerase Chain Reaction” (PCR), clonagem gênica e mutagênese sítio-dirigida.

“Todos os nossos sonhos podem tornar-se realidade, se tivermos a coragem de persegui-los.”

Walt Disney

A Deus,

Aos meus pais Julio Roberto e Sueley,

Ao meu irmão Paulo Roberto, e

Ao meu noivo Edivilson.

Sem vocês nada disto seria possível,

sou muito grata por tê-los em minha vida!

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por se fazer presente em todos os dias de minha vida, dando-me ânimo, inspiração, força, coragem e permitindo a conclusão de mais um trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani, pela confiança, estímulo, ensinamentos, por sempre me acalmar nas inúmeras vezes que fui até sua sala precisando de apoio e pela confiança depositada em mim e no meu trabalho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, pelos ensinamentos, sugestões, aprendizado e por ter me acolhido e aceitado orientar no início de toda essa caminhada. Aprendi muito com o senhor.

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pelo acolhimento, paciência e disposição em me ajudar quando necessitei.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira, por ter permitido que eu fizesse algumas análises no Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), e por todas as vezes que me ajudou quando necessitei de seu auxílio e conhecimento.

Ao pessoal do laboratório LGB, por ter me acolhido no período que estive lá desenvolvendo meu estudo, em especial à mestrandia Lúcia Bonci, por toda ajuda e receptividade.

Ao Dr. Elkin Fernando Rodas Mendoza, por ter me ajudado na realização da modelagem das proteínas, por sempre me incentivar e acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava; obrigada por todo apoio, ensinamentos e ajuda.

À Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho, que como o próprio apelido diz é muitas vezes uma “mãe” para muitos de nós, pela paciência em escutar nossos lamentos e por todo apoio e ajuda fornecida na realização das reações de qRT-PCR; muito obrigada, de coração.

Ao Dr. Rafael Marini Ferreira, pelas inúmeras ajudas, seja tirando dúvidas, dando conselhos ou analisando comigo os resultados dos sequenciamentos.

A Dra. Helen Alves Penha, pelas várias vezes que bati na porta da sua sala precisando de ajuda e sempre fui bem recebida e acolhida, pelo apoio e pelas conversas que me acalmavam.

Aos membros das minhas bancas de qualificação e defesa, por terem aceitado prontamente o convite para contribuírem com suas sugestões para a melhoria da pesquisa.

Ao meu pai, Julio Roberto Araujo de Amorim, que continua me provando que o amor à profissão é o que nos torna excelentes profissionais, por ser um dos maiores incentivadores e exemplo de profissional para mim. Você é o meu orgulho, além de ser a pessoa que me ensinou o pouco que sei sobre pesquisa científica. Obrigada pelos ensinamentos e por todo seu carinho, por sempre me ajudar em todos os meus trabalhos, desde a época da escola até o doutorado, e pelo amor e apoio incondicional; amo muito você!

À minha mãe Suely, por ser a melhor mãe do mundo e, apesar da distância física, sempre se fazer presente na minha vida, amparando-me nos momentos mais difíceis, dando-me força e coragem para lutar pelos meus sonhos e mostrando-me que sou capaz de realizá-los. Amo muito você, obrigada por existir em minha vida!

Ao meu irmão Paulo Roberto, por estar presente em todos os momentos, apoiando-me, protegendo-me e dando-me a certeza de que nunca estarei sozinha na caminhada da vida; amo muito você!

Aos demais familiares que, mesmo de longe, torceram por mim e pelo meu sucesso.

Ao meu noivo Edivilson Filho, por ter deixado tudo para me acompanhar nessa “louca” caminhada, tornando-a mais prazerosa e amena com seu amor, paciência e companhia. Obrigada por me aguentar e cuidar de mim nos momentos em que nem eu mesma me suportava. Amo muito você!

Aos meus sogros (Edivilson e Sandra) e cunhados (Eduardo, Natally e Priscilla), por serem uma família para mim, por terem me acolhido tão bem e pela torcida e apoio.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM), aos que já se foram (Aline Belezine, Aline Lopes, Ângela, Bruna, Claudênia, Daniele, Fernando, Lucília e Thaísa) e aos que continuam comigo (Amanda, Bruno, Catarina, Danilo, Flávinha, Iashilei, Jéssica, Juliana, Luís, Michelle e Wallynson). Esse, com certeza, foi o melhor laboratório em que já trabalhei! Obrigada pela companhia de cada um de vocês, pelas conversas, cafés e risadas!

À Ana e Tamiris, que, além de companheiras de laboratório e de sala, tornaram-se minha família aqui em Jaboticabal; amo vocês!

À Camila, que me ajudou com as leituras da integridade do RNA total das amostras.

A todos os funcionários do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), em especial a Agda e a Mariza, pela paciência e apoio.

A todos os professores, funcionários e estagiários do Departamento de Tecnologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Universidade Estadual Paulista – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao projeto Bioinformática, Genômica e Associados (BIGA-CAPES), pelo aprendizado e pela bolsa cedida.

Aos amigos feitos aqui em Jaboticabal, pela torcida, boas conversas, risadas e momentos de distração; e principalmente aos amigos mais antigos, pela paciência, por muitas vezes não conseguir estar presente em momentos especiais, mesmo não sendo essa a minha vontade.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Importância da citricultura no Brasil	5
2.2 Cancro cítrico	6
2.2.1 Origem, tipos e estratégias de controle	6
2.2.2 Agente etiológico e sintomatologia	8
2.3 Sistema de dois componentes (TCS)	12
2.4 Sistema regulador de nitrogênio (NTR)	14
2.5 Mutagênese sítio-dirigida por PCR	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Mutagênese sítio-dirigida por PCR dos genes <i>ntrB</i> e <i>ntrC</i>	18
3.1.1 Desenho dos oligonucleotídeos	18
3.1.2 Obtenção dos fragmentos A-B, C-D e A-D por PCR	23
3.1.3 Reação de digestão com endonucleases de restrição dos fragmentos A- DntrB e A-DntrC e clonagem no vetor suicida pNPTS138	24
3.1.4 Transformação em células de E. coli DH10B quimicamente competente	26
3.1.5 Transformação em células de XccA eletrocompetentes	28
3.1.6 Seleção e confirmação dos mutantes	30

3.1.7 Confirmação da identidade da XccA mutada	31
3.2 Teste de patogenicidade <i>in planta</i>	32
3.3 Crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	33
3.4 Crescimento bacteriano <i>in planta</i>	33
3.5 Crescimento bacteriano em meios mínimos com e sem albumina sérica bovina (BSA)	34
3.6 Formação de biofilme <i>in vitro</i>	34
3.7 Extração e quantificação de goma xantana	35
3.8 Avaliação da motilidade bacteriana	35
3.9 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	36
3.9.1 Obtenção de RNA total bacteriano em meios NB e XVM2	36
3.9.2 Síntese da primeira fita de cDNA	37
3.9.3 Oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR	37
3.9.4 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores	39
3.9.5 Curva padrão para determinação da concentração de cDNA ideal	39
3.9.6 Quantificação relativa da expressão dos genes	40
3.10 Análises estatísticas dos dados	41
3.11 Modelagem molecular das proteínas NtrC e HrpG	41
4 RESULTADOS	43
4.1 Mutação sítio-dirigida por PCR para obtenção dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$...	43
4.2 Teste de patogenicidade e curvas de crescimento <i>in planta</i> e <i>in vitro</i>	45
4.3 Crescimento bacteriano em meios mínimos com e sem albumina sérica bovina (BSA)	50
4.4 Formação de biofilme e produção de goma xantana <i>in vitro</i>	52
4.5 Motilidade bacteriana tipo “swimming” e tipo “swarming”	54

4.6 Expressão relativa dos genes do sistema de secreção tipo 3 (SST3)	55
4.7 Modelagem molecular das proteínas NtrC e HrpG	56
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES	66
7 REFERÊNCIAS	67

GENES DO METABOLISMO DO NITROGÊNIO E SUAS IMPLICAÇÕES NA PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DA *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

RESUMO – O cancro cítrico tipo A, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XccA), é uma das doenças de citros mais importantes, afetando todas as cultivares comerciais, para a qual não existem ainda estratégias de controle eficientes. Os genes *ntrB* e *ntrC* codificam, respectivamente, a histidina quinase (HK) e o regulador de respostas (RR), pertencentes a um sistema de dois componentes (TCSs), que atuam no sistema regulador de nitrogênio (NTR). Porém, o possível papel desses genes na virulência da XccA e de outros fitopatógenos ainda não foi elucidado. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos dos genes *ntrB* e *ntrC* no desenvolvimento do cancro cítrico em limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), bem como a possível relação desses genes com a regulação da expressão de genes do sistema de secreção tipo 3 (SST3), considerado um dos principais fatores de virulência da XccA. Os mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ foram obtidos pela técnica de mutagênese sítio-dirigida por reação em cadeia da polimerase de extensão por sobreposição. A mutação dos genes causou redução na sintomatologia do cancro cítrico e diminuição da população bacteriana no espaço intercelular do tecido foliar da planta. A análise das curvas de crescimento *in vitro* revelou que a ausência do gene *ntrB* não alterou a viabilidade da bactéria, enquanto a mutação do gene *ntrC* afetou o “fitness” bacteriano em meio de cultura NB. Análises *in vitro* indicaram que o mutante $\Delta ntrC$ formou duas vezes mais biofilme e produziu cinco vezes mais goma xantana do que a XccA 306 *in vitro*. A expressão dos genes (*hpa1*, *hrpG*, *hrpX*, *hrpE*, *hrpW* e *hrpD6*) do SST3 avaliados foi significativamente maior ($p < 0,05$) no mutante $\Delta ntrC$ do que na XccA 306 e no $\Delta ntrB$, indicando que *ntrC* possa atuar na regulação do SST3. Porém, o nível de expressão desses genes no mutante $\Delta ntrB$ não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à XccA 306. A modelagem molecular revelou semelhança estrutural entre as regiões receptoras de NtrC e HrpG, sugerindo que a fosforilação de HrpG por NtrB possa ocorrer *in vivo*. Em síntese, os resultados obtidos neste estudo indicam que a mutação dos genes *ntrB* e *ntrC* afeta o desenvolvimento do cancro cítrico em limão-cravo e que o gene *ntrC* pode atuar na regulação dos mecanismos de formação de biofilme, produção de goma xantana e expressão de genes do SST3 e/ou que a ausência desse gene ocasione um desequilíbrio celular na XccA 306, resultando na alteração desses mecanismos, enquanto NtrB pode apresentar papel na regulação de genes do SST3 por meio da fosforilação de HrpG.

Palavras-chave: cancro cítrico, mutagênese, sistema regulador de nitrogênio (NTR), sistema regulador de dois componentes (TCS), sistema de secreção tipo 3 (SST3)

GENES OF NITROGEN METABOLISM AND ITS IMPLICATIONS IN THE PATHOGENICITY AND VIRULENCE OF *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

ABSTRACT – The citrus canker type A, provoked by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XccA), is one of the most important citrus diseases, affecting all the commercial cultivars, for which there are no effective control strategies. The *ntrB* and *ntrC* genes encode a histidine kinase (HK) and the response regulator (RR), respectively, belong to a two-component system (TCSs), related to the nitrogen regulatory system (NTR). However, the possible role of *ntrB* and *ntrC* genes in the virulence of XccA and other phytopathogens has not yet been elucidated. Therefore, the aim of this study was to investigate the impact of the *ntrB* and *ntrC* genes on the development of citrus canker in rangpur lime (*Citrus limonia* Osbeck), as well as the possible relation of *ntrB* and *ntrC* genes with the regulation of the type 3 secretion system (T3SS) gene expression, which is considered one of the main virulence factors of XccA. The $\Delta ntrB$ and $\Delta ntrC$ were obtained by site-directed mutagenesis through overlap extension polymerase chain reaction. The mutation of the *ntrB* and *ntrC* genes caused a reduction of the citrus canker symptoms, and decrease of the bacterial population in the intracellular space of the foliar tissue of the plant. *In vitro* growth curves analysis revealed that the $\Delta ntrB$ did not affect the viability of the bacterium, whereas the $\Delta ntrC$ affected the bacterial fitness in NB culture medium. *In vitro* analysis indicated that the $\Delta ntrC$ formed 2x more biofilm, and produced 5x xanthan gum compared to the XccA 306. The T3SS related genes (*hpa1*, *hrpG*, *hrpX*, *hrpE*, *hrpW* and *hrpD6*) expression was significantly higher ($p < 0.05$) in the $\Delta ntrC$ than in the XccA 306 and the $\Delta ntrB$, indicating that *ntrC* can modulate the regulation of T3SS. However, the level of expression of these genes in the $\Delta ntrB$ did not differ ($p > 0.05$) in relation to the XccA 306. Molecular modeling revealed structural similarity between NtrC and HrpG receptors motifs, suggesting that phosphorylation of HrpG by NtrB may occur *in vivo*. Overall, the results obtained in this study strongly suggest that the mutation of the *ntrB* and *ntrC* genes affect the development of rangpur lime citrus canker and that *ntrC* gene may play an important role in the regulation of the mechanisms of biofilm formation, xanthan gum production and T3SS gene expression and/or that the absence of this gene causes a cellular imbalance in XccA 306 resulting in the alteration of these mechanism, whereas the NtrB may have a role with the regulation of T3SS genes by phosphorylation of HrpG.

Keywords: citrus canker, mutagenesis, nitrogen regulation system (NTR), two-component regulatory system (TCS), Type 3 secretion system (T3SS)

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> , a qual é possível observar a presença do flagelo único (A). Fonte: MOREIRA et al. (2010). Colônias de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> crescidas em meio de cultura ágar nutriente (B)	9
Figura 2. Sintomas de cancro cítrico em folhas (A), frutos (B) e ramos (C) de laranja	10
Figura 3. Esquema representativo da rede reguladora global de fatores de virulência da XccA	11
Figura 4. Esquema geral do controle da expressão gênica por um sistema de dois componentes (TCS) bacteriano. P = fósforo; His = histidina; Asp = aspartato; ATP = adenosina trifosfato; e ADP = adenosina difosfato.....	13
Figura 5. Modelo esquemático para a regulação das atividades das proteínas glutamina sintetase (GS) e NtrC em resposta ao nível de nitrogênio. A adenil transferase (UTase), produto do gene <i>glnD</i> , catalisa a uridilação e desuridilação da proteína trimérica PII, produto de <i>glnB</i> . ATase catalisa a adenilação e desadenilação de GS. A proteína NtrB catalisa a fosforilação e desfosforilação da NtrC	15
Figura 6. Diagrama esquemático de um protocolo de mutagenese de deleção sítio-dirigida por PCR de extensão por sobreposição.....	17
Figura 7. Mapa genômico circular do vetor suicida pNPTS138	20
Figura 8. Localização dos oligonucleotídeos A-B e C-D e sequência de nucleotídeos em formato FASTA do gene <i>ntrB</i> presente no banco de dados “Genbank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). A região e a direção dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão representas pelas setas em azul, laranja, roxo e vermelho, respectivamente. A sequência de nucleotídeos delimitada pelo retângulo em linha preta corresponde à sequência do gene <i>ntrB</i>	21
Figura 9. Localização dos oligonucleotídeos A-B e C-D e sequência de nucleotídeos em formato FASTA do gene <i>ntrC</i> , presente no banco de dados “Genbank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). A região e a direção dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão representas pelas setas em azul, laranja, roxo e vermelho, respectivamente. A sequência de nucleotídeos delimitada pelo retângulo em linha	

preta corresponde à sequência do gene *ntrC* 22

Figura 10. Geéis de eletroforese em agarose (1%) dos produtos resultantes das reações de PCR primárias (AB e CD) e PCR de ligação (AD) para obtenção dos mutantes $\Delta ntrB$ (A) e $\Delta ntrC$ (B). M: marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas). AB: Fragmento AB (788 pb), CD: Fragmento CD (855 pb) e AD: Fragmento AD (1.643 pb) (A). AB: Fragmento AB (677 pb), CD: Fragmento CD (787 pb) e AD: Fragmento AD (1.446 pb) (B)..... 43

Figura 11. Geéis de eletroforese em agarose (1%) dos produtos resultantes das reações de PCR com os oligonucleotídeos A e D e os DNAs genômicos da XccA 306 (controle positivo) e das colônias provenientes dos mutantes $\Delta ntrB$ (A) e $\Delta ntrC$ (B), e com os oligonucleotídeos Xac01 e Xac02 (específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*) e os DNAs de XauB e XauC (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, controles negativos (C). M: Marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas); C⁺: XccA 306; 1 a 7: colônias de $\Delta ntrB$ mutadas (A). M: Marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas); C⁺: XccA 306; 1, 2, 3, 4, 8 e 9: colônias de $\Delta ntrC$ não mutadas; 5, 6 e 7: colônias mutadas (B). C⁺: XccA 306; 1: XauB; 2: XauC; 3: Mutante $\Delta ntrB$; 4: Mutante $\Delta ntrC$ (C)..... 45

Figura 12. Teste de patogenicidade da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrB$, inoculados em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) na concentração de 10^6 UFC/ml, com sintomas avaliados aos 7, 15 e 30 dias após a inoculação (DAI). Parte superior da figura, inoculação pelo método de infiltração por pressão e parte inferior da figura, inoculação pelo método de perfuração do limbo foliar..... 47

Figura 13. Curva de crescimento *in planta* da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrB$, em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), a 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 25 DAI, gerada com base na contagem de colônias (A). Curva de crescimento *in vitro* da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrB$ em meio líquido NB, elaborada a partir dos valores da leitura da densidade óptica (DO_{600nm}) por um período de 24 horas (B)..... 48

Figura 14. Teste de patogenicidade da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrC$, inoculados em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) na concentração de 10^6 UFC/ml, com sintomas avaliados aos 7, 15 e 30 dias após a inoculação (DAI). Parte superior da figura, inoculação pelo método de infiltração por pressão e parte inferior da figura, inoculação pelo método de perfuração do limbo foliar..... 49

Figura 15. Curva de crescimento *in planta* da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrC$, em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), a 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 25 DAI, gerada com base na contagem de colônias (A). Curva de crescimento *in vitro* da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrC$ em meio líquido NB, elaborada a partir dos valores da leitura da densidade óptica (DO_{600nm}) por um período de 30 horas (B)..... 50

Figura 16. Crescimento bacteriano *in vitro* da XccA 306 e dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ nos meios mínimos, com e sem albumina sérica bovina (BSA), XAM1 (A), XAM1 - BSA (B), XVM2 (C) e XVM2 + BSA (D). Para a elaboração das curvas,

foram utilizados os dados de medição da DO_{600nm} no período de 37 horas..... 51

Figura 17. Quantificação da formação de biofilme *in vitro* pela XccA 306 e pelos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ por meio da leitura da densidade ótica (DO_{595nm}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 52

Figura 18. Produção de goma xantana por massa de bactéria (mg goma/mg bacteriana) pela XccA 306 e pelos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ (A). Concentração de biomassa e goma (mg/ml) na XccA 306 e nos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 53

Figura 19. Teste de motilidade tipo “swimming” (A) e tipo “swarming” (B) realizado pela medição dos diâmetros das colônias da XccA 306 e dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 55

Figura 20. Expressão relativa dos genes *hpa1*, *hrpG*, *hrpX*, *hrpE*, *hrpW* e *hrpD6*, que fazem parte do sistema de secreção tipo 3 (SST3). Os valores do eixo Y (log₂) indicam a expressão dos genes pela XccA e pelos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$, cultivados em meio líquido XVM2, em relação à XccA cultivada em meio líquido NB (controle). Médias seguidas pela mesma letra, para cada gene, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade..... 56

Figura 21. Modelagem molecular das proteínas NtrC e HrpG da XccA 306. Regiões modeladas em NtrC (região receptora: 10-122 aa) e HrpG (região receptora: 8-122 aa) que estão envolvidas no processo de fosforilação e valores de porcentagem de resíduos em regiões favoráveis iguais a 84,7% e 88,5%, respectivamente, para as proteínas NtrC e HrpG (A). Alinhamento tridimensional entre NtrC e HrpG com valor de “Root Mean Square Deviation” (RMSD) igual a 0,535 Å (B). D = domínio; P = fósforo; e HTH = domínio hélice-volta-hélice..... 58

Figura 22. Esquema representativo da fosforilação do HrpG pela histidina quinase (HK NtrB) que atua no sistema regulador do nitrogênio (NTR). Em baixas concentrações de nitrogênio extracelular (N), a NtrB fosforila os reguladores de resposta NtrC e HrpG, ativando-os. NtrC fosforilado promove a expressão de genes envolvidos no metabolismo de N; enquanto HrpG, na forma ativa, induz a transcrição de *hrpX*, que ativa a expressão de um grande conjunto de genes de virulência. Esse conjunto de genes codificam o SST3 e os efetores do SST3 (eSST3). Em presença de altas concentrações de N extracelular, a NtrB estimula a desfosforilação de NtrC e HrpG, inativando-os, o que reprime a expressão de genes envolvidos no metabolismo de N e de genes do SST3. MI = membrana interna; ME = membrana externa; e P = fósforo. Setas de dupla ponta indicam interação entre as proteínas..... 65

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Tamanho dos fragmentos (“amplicon”) e sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a obtenção do mutante <i>ΔntrB</i>	18
Tabela 2. Tamanho dos fragmentos (“amplicon”) e sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a obtenção do mutante <i>ΔntrC</i>	19
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos fragmentos A- <i>DntrB</i> e A- <i>DntrC</i> clonados no vetor pNPTS138	28
Tabela 4. Características gerais dos oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR	38
Tabela 5. Concentrações de oligonucleotídeos iniciadores empregadas nas titulações	39

1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico Asiático ou cancro tipo A, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XccA), é uma das doenças de citros mais importantes, que afeta todas as espécies e cultivares comerciais, incluindo toranja, limões, lima mexicana ou ácida galego e laranjas-doces (JALAN et al., 2014; SONG et al., 2015; ABE; BENEDETTI, 2016; FERREIRA et al., 2017). De modo geral, o controle do cancro cítrico é feito por erradicação do material vegetal contaminado, ocasionando perdas econômicas consideráveis (GOTTWALD et al., 2001; GRAHAM et al., 2004; SONG et al., 2015), e também por pulverização cúprica de pomares afetados (GOTTWALD et al., 2001; GOTTWALD et al., 2002; LI; WANG, 2014), que pode levar tanto ao surgimento de isolados bacterianos resistentes, fato já observado (GOCHEZ et al., 2018), quanto à ocorrência de contaminação ambiental por metais pesados (ALVA, 1993; COOKSEY, 1994; BEHLAU et al., 2010). Por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias de controle eficientes, que sejam sustentáveis econômica e ambientalmente (GRAHAM et al., 2004; YAN; WANG, 2012).

Várias abordagens moleculares para o estudo desse fitopatógeno foram propostas nas últimas décadas. Porém, somente após a realização do sequenciamento e da análise genômica da cepa brasileira 306 (XccA 306) em 2002, foi possível identificar diversos genes relacionados com o processo de patogenicidade e fatores de virulência (DA SILVA et al., 2002). Tais fatores de virulência incluem os polissacarídeos extracelulares (EPS), os lipopolissacarídeos (LPS), as enzimas de degradação da parede celular, os efetores e seus sistemas de secreção, o sistema de regulação de dois componentes (TCS) e o sistema sinalização célula a célula ou “quorum-sensing” (JALAN et al., 2014).

Em adição à análise genômica, técnicas de genômica funcional também têm sido empregadas para a investigação da interação da XccA com seus diversos hospedeiros, visando testar genes reconhecidamente relacionados com a patogenicidade e buscar novos genes alvos que possam elucidar o mecanismo de interação planta-patógeno. Uma dessas técnicas é a mutagênese sítio-dirigida por “Polymerase Chain Reaction” (PCR), que possibilita inserir ou deletar um gene alvo

com precisão (LEE et al., 2004). Outro método empregado em pesquisas de genômica funcional é o da mutação aleatória mediada pelo “transposon” Tn5. No entanto, apesar de diversos estudos realizados nos últimos anos, os mecanismos utilizados pela XccA na colonização e no ataque de plantas hospedeiras estão longe de serem totalmente caracterizados e compreendidos (LAIA et al., 2009; BAPTISTA et al., 2010; GUO et al., 2010; LI; WANG, 2011a; YAN; WANG, 2012; SONG et al., 2015; GRANATO et al., 2016).

Recentemente, abordagens baseadas em genômica comparativa lançaram novas hipóteses sobre os mecanismos de virulência da XccA. Tais abordagens permitiram identificar 114 genes relacionados aos sistemas reguladores de dois componentes (TCSs) (QIAN; HAN; HE, 2008; YAN; WANG, 2011; JALAN et al., 2014). Os TCSs são compostos pela histidina quinase (HK), uma proteína sensora de sinal, e pelo regulador de resposta (RR). Em resposta às mudanças no ambiente externo, a HK autofosforila-se em um resíduo de histidina conservado e, posteriormente, catalisa a fosfotransferência para um resíduo de aspartato conservado no RR (YAN; WANG, 2011; JALAN et al., 2014; PARISH, 2014). Entretanto, apesar de ter sido sugerido que os TCSs desempenhem importantes papéis em múltiplas funções celulares da XccA, apenas alguns desses sistemas foram estudados por suas implicações na virulência, como é o caso do HrpG (YAMAZAKI; HIRATA; TSUYUMU, 2008; YAN; WANG, 2011). O regulador de resposta órfão (HrpG) é responsável pela regulação dos genes *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”) que codificam o sistema de secreção tipo 3 (SST3) na XccA (JALAN et al., 2014), considerado um dos principais fatores de virulência em muitas bactérias patogênicas (LI et al., 2010).

Em estudos realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) da Unesp/FCAV, em Jaboticabal, visando avaliar a influência da albumina, adicionada em meio de cultura XVM2, na expressão de genes do SST3 da XccA 306 por análises de qRT-PCR, constatou-se um significativo efeito de repressão desses genes. Esse resultado sugeriu que fontes de nitrogênio orgânico poderiam atuar como um dos sinais reconhecidos pela XccA 306 para iniciar a cascata de ativação do SST3 (RODAS MENDOZA, 2016).

O nitrogênio é um elemento químico que faz parte da composição de moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e outros compostos nitrogenados em bactérias, sendo, assim, um dos elementos químicos mais abundantes na matéria viva (ARCONDÉGUY, 2001; SONG et al., 2015). Na maioria das proteobactérias, o metabolismo de nitrogênio é controlado pelo sistema regulador de nitrogênio (NTR). Esse sistema foi inicialmente descrito como sendo composto por quatro proteínas: uma enzima com a função de uridil transferase (UTase) e/ou de remoção de uridil (UR), codificada pelo gene *glnD*; uma proteína trimérica (PII) codificada por *glnB*; e o sistema regulador de dois componentes, produto dos genes *ntrB* e *ntrC*, constituído pela proteína histidina quinase (NtrB) e pelo regulador de resposta (NtrC) (MERRICK; EDWARDS, 1995; ZHANG; POHLMANN; ROBERTS, 2005; LIU et al., 2017).

A hipótese do envolvimento de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio e ao sistema NTR com a emergência de virulência e patogenicidade foi averiguada em outros estudos. Yan e Wang (2012), por exemplo, constataram que a mutação do gene *gltB* da XccA 306 resultou em atraso do desenvolvimento de sintomas do cancro cítrico em folhas de toranja. Resultados similares também foram reportados em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Pandey et al. (2014) verificaram que a mutação dos genes *gltB/D* gerou fenótipo com redução de lesão, virulência e crescimento em meio mínimo com baixos níveis de amônia como única fonte de nitrogênio. Esse foi o primeiro relato de que mutações nos genes *gltB/D* de Xoo causaram redução da virulência.

Analisando a XccA, cepa 29-1 originalmente isolada no continente Asiático, Song et al. (2015) identificaram sete novos genes relacionados à virulência: *tpiA*, *ppsA*, *glnB*, *dnaJ*, *XAC29_09950*, *XAC29_03475* e *XAC29_11940*. Como o gene *glnB* atua na modulação da atividade do sistema regulador de dois componentes NtrB/NtrC em resposta aos níveis de nitrogênio no interior das células (MERRICK; EDWARDS, 1995; ATKINSON; NINFA, 1998), Song et al. (2015) sugeriram que a utilização de fontes de nitrogênio é fundamental para o crescimento e o sucesso da colonização de plantas hospedeiras infectadas pela XccA 29-1 durante o desenvolvimento do cancro.

Apesar de existir estudos, com várias bactérias, sobre a função e a regulação dos genes *ntrB* e *ntrC* no sistema NTR (SHIAU et al., 1992; PAZ-YEPES; HERRERO; FLORES, 2007; HERVA'S et al., 2008; HERVA'S et al., 2009), o possível papel desses genes na virulência da XccA e de outros fitopatógenos ainda não foi elucidado. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da mutação dos genes *ntrB* e *ntrC* no desenvolvimento do cancro cítrico em limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), espécie considerada suscetível à cancriose A, e suas implicações na virulência e patogenicidade da XccA 306, bem como a possível relação desses genes com a regulação da expressão dos genes do SST3.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da citricultura no Brasil

Originada no Sudeste Asiático, por volta de 4.000 anos atrás (NEVES et al., 2010), a laranja foi introduzida no Brasil no início da colonização. Nessa época, foram plantadas as primeiras sementes de laranja-doce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) nos estados da Bahia e de São Paulo. Devido às melhores condições encontradas no País para se desenvolver e produzir, as plantas cítricas se expandiram por todo o território nacional; e, a partir daí, a citricultura destacou-se em vários estados (NEVES et al., 2010; LOPES et al., 2011).

O setor citrícola brasileiro foi impulsionado por dois fatores muito importantes: 1) a construção da primeira indústria de processamento de laranja em 1959 e 2) a ocorrência de uma geada no ano de 1962, que atingiu as plantações de laranja da Flórida, nos Estados Unidos, considerados, até o momento, os maiores produtores mundiais da fruta e de suco (NEVES et al., 2010). Porém, só a partir da década de 1980, com a combinação de uma citricultura desenvolvida e de uma indústria competitiva, foi que o Brasil conseguiu superar a produção de laranja dos Estados Unidos, resultando na consolidação da citricultura brasileira (NEVES et al., 2010).

Com uma estimativa de produção anual de cerca de 46 milhões de toneladas em 2016, a cultura da laranja contribui de forma significativa para economia mundial, sendo o Brasil o maior produtor, seguido por China, União Europeia, Estados Unidos, México e Egito (AGRIANUAL, 2017). Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), a produção nacional de laranja em 2016 foi de 17,261 milhões de toneladas; das quais, quase a totalidade (12,847 milhões de toneladas ou 74,4%) foi produzida no Estado de São Paulo, seguido por Bahia (6,5%), Minas Gerais (5,6%), Paraná (4,3%) e Sergipe (2,3%). No Brasil, além do consumo *in natura*, a produção de laranja destina-se, principalmente, ao processamento industrial de suco concentrado.

A citricultura tem grandes efeitos na formação de capital, na geração de renda, na agregação de valor e no desenvolvimento regional (ZULIAN; DÖRR; ALMEIDA, 2013). Isso porque o setor citrícola tem um forte impacto na economia

dos 350 municípios de São Paulo e Triângulo Mineiro onde a atividade é predominante, além de seus arredores, com a geração de 200 mil empregos diretos e indiretos e de um Produto Interno Bruto (PIB) de US\$ 6,5 bilhões em toda a sua cadeia produtiva (NEVES; TROMBIN, 2017).

Entretanto, a cultura do citros tem se deparado com a ocorrência de diversas pragas e doenças, como o “greening” (“huanglongbing/HLB”), a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico, que, além de ocasionarem grandes perdas econômicas, aumentam o custo de produção da cultura (GRAHAM et al., 2004; JALAN et al., 2014). Entre os problemas fitossanitários que acometem a cultura do citros, o cancro cítrico é considerado uma das doenças mais agressivas e generalizadas, afetando todas as espécies e das cultivares comercialmente importantes (GRAHAM et al., 2004; JALAN et al., 2014; FAVARO et al., 2017). A presença do cancro cítrico em uma determinada área impacta também a economia pelo fato de ocasionar restrições de quarentena imediatas, impostas pelas regiões consideradas livres da doença; restrições essas que dificultam o transporte interestadual e internacional de frutas e de materiais vegetais para as áreas sem infestação (GRAHAM et al., 2004; JALAN et al., 2014; FAVARO et al., 2017).

2.2 Cancro cítrico

2.2.1 Origem, tipos e estratégias de controle

A origem geográfica exata do cancro cítrico ainda gera discussões. Fawcett e Jenkins (1933) afirmam que o cancro cítrico surgiu provavelmente na Índia e na ilha de Java na Indonésia, uma vez que lesões de cancro em mudas procedentes dessas duas regiões foram observadas no herbário de citros mais antigo, o “Royal Botanic Gardens”, em Londres, Inglaterra (DAS, 2003). Esse fato sugere que o cancro cítrico foi originado no Sudeste Asiático, de onde a doença foi disseminada para outras áreas de cultivos de citros, estando presente em várias partes do mundo, como Ásia, África do Sul e Central, Oriente Médio, Austrália, Nova Zelândia, Ilhas do Pacífico, América do Sul e Sudeste dos Estados Unidos, espalhando-se para todos os continentes produtores de citros, com exceção do Europeu (SCHUBERT et al., 2001; DAS, 2003; JALAN et al., 2014; FERENCÉ et al., 2018).

No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram na década de 50, no município de Presidente Prudente, localizado no interior de São Paulo (BITANCOURT, 1957). Nessa época, medidas de exclusão e de erradicação foram adotadas com o intuito de conter a disseminação do cancro cítrico. No entanto, apesar dos esforços realizados para tentar controlar a propagação da bactéria, a doença expandiu-se para outros estados, como Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Maranhão e Roraima (AMARAL, 1957; LEITE JUNIOR; MOHAN, 1990; FEICHTENBERGER; MULLER; GUIRADO, 1997; MACIEL; DUARTE; AYUB, 1998; BARBOSA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2003; BELASQUE JUNIOR et al., 2009).

Vários tipos de cancro cítrico foram relatados, os quais se diferenciam, principalmente, em relação à distribuição geográfica e à gama de hospedeiros do patógeno (STALL; SEYMOUR, 1983). Entre eles, o cancro cítrico Asiático ou cancro tipo A, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XccA), que é a forma mais severa da doença e afeta um grande número de espécies da família *Rutaceae* (DA SILVA et al., 2002; DAS, 2003). Entretanto, mais recentemente duas diferentes estirpes de XccA, com patogenicidade limitada, foram identificadas: a primeira, designada como A*, causa lesões típicas de cancro em lima mexicana ou ácida galego (*Citrus aurantifolia*) e a segunda, classificada como A^w, além da lima mexicana, ataca o “alemow” (*Citrus machrophylla*). Essas estirpes foram encontradas no sudeste da Ásia (SUN et al., 2004; JALAN et al., 2014) e no sul da Flórida, respectivamente (SCHUBERT et al., 2001; SUN et al., 2004; REZAEI; SHAMS-BAKHSH; ALIZADEH, 2012).

Por sua vez, além de apresentar distribuição geográfica e gama de hospedeiros limitada quando comparada com a XccA, a bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xau) causa as cancroses tipo B (XauB) e C (XauC), que são menos agressivas do que a cancrose tipo A. A XauB é encontrada apenas na Argentina, no Uruguai e no Paraguai, enquanto a XauC restringe-se ao Brasil (STALL; CIVEROLO, 1991; JALAN et al., 2014), mais especificamente ao Estado de São Paulo (CAICEDO; VILLAMIZAR; FERRO, 2017). Recentemente, Constantin et al. (2016), utilizando uma abordagem polifásica que incluiu a análise da sequência multilocus (MLSA), o cálculo de Hibridização DNA-DNA (HDD) dos valores médios

de identidade dos nucleotídeos do genoma completo e as análises fenotípicas, recomendaram que a nomenclatura *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* fosse alterada para *X. citri* pv. *aurantifolii*.

De acordo com a nova legislação federal, Instrução Normativa nº. 37/2016, as estratégias de controle do cancro cítrico, adotadas no Brasil, dependem do *status* fitossanitário da doença na área, as quais são: 1) Área com Praga Ausente: são os estados da federação sem ocorrência prévia ou presente da doença; 2) Área Livre da Praga (ALP): área específica e definida sem ocorrência da doença em estado onde a doença está presente; 3) Área sob Erradicação ou Supressão: área onde a praga ocorre com distribuição restrita ou em baixa incidência em estado onde a doença está presente; e 4) Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR): área onde o cancro cítrico está amplamente distribuído entre as plantas em estado onde a doença está presente (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017).

Em São Paulo, conforme foi determinado pela Resolução nº. 10/2017 da Secretaria de Agricultura e Abastecimento (SAA), a estratégia de controle adotada a partir de 2017 é o Sistema de Mitigação de Risco (SMR). Não sendo mais obrigada a realização da erradicação de plantas com sintomas de cancro cítrico nos pomares. Isso porque as ações passaram a se concentrar na realização de um conjunto de medidas de manejo, que visam reduzir o impacto da doença na produção (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017). No entanto, até o momento não existem estratégias de supressão eficazes para as cultivares de citros suscetíveis cultivadas nas áreas tropicais e subtropicais (SCHUBERT et al., 2001). Devido a isso, o cancro cítrico é considerado uma das doenças de citros mais importantes (ARTIER et al., 2018).

2.2.2 Agente etiológico e sintomatologia

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (XccA), antes denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, é o agente causal do cancro cítrico Asiático ou cancro cítrico A (FERREIRA et al., 2017). Análises filogenéticas classificam esse fitopatógeno no Filo *Proteobacteria*, Classe *Gammaproteobacteria*, Ordem *Xanthomonadales*, Família *Xanthomonadaceae* e Gênero *Xanthomonas* (JALAN et al., 2014; FERENCE et al., 2018). Uma das características do gênero *Xanthomonas* é a síntese e secreção do exopolissacarídeo ou polissacarídeo extracelular (EPS)

xantana, principalmente nas fases de crescimento logarítmica e estacionária (HARDING et al., 1995). A biossíntese e a exportação de EPS em XccA são codificadas por agrupamento de genes *gum* (*gumB* a *gumP*) (LI; WANG, 2011b; CAICEDO; VILLAMIZAR; FERRO, 2017). A xantana é altamente regulada pelo “cluster” de genes *rpf* (“regulation of pathogenicity factors” ou regulação de fatores de patogenicidade) (DUNGER et al., 2007; LEE et al., 2009).

A XccA caracteriza-se por ser uma bactéria em forma de bastonete (1,5 a 2,0 μm X 0,5 a 0,75 μm), Gram-negativa, obrigatoriamente aeróbia, quimiotrófica e móvel por um único flagelo polar (Figura 1A) (DAS, 2003; JALAN et al., 2014; FERENCE et al., 2018). Em meio de cultura, suas colônias apresentam formato geralmente convexo e coloração amarela, devida à produção de um pigmento conhecido como xantomonadina (Figura 1B), com temperatura de crescimento ótima variando entre 28°C a 30°C (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; DAS, 2003; JALAN et al., 2014; FERENCE et al., 2018).

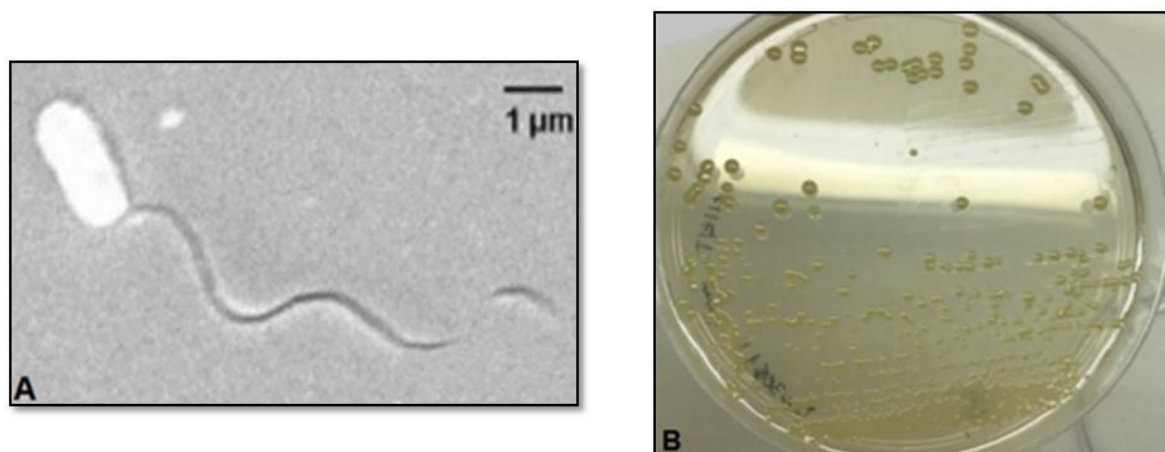


Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, na qual é possível observar a presença do flagelo único (A). Fonte: MOREIRA et al. (2010). Colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* crescidas em meio de cultura ágar nutriente (B).

As plantas infectadas por esse fitopatógeno caracterizam-se pela presença de hiperplasia (divisão excessiva de células mitóticas), hipertrofia e necrose do tecido vegetal (SCHUBERT et al., 2001; FERREIRA et al., 2017; FERENCE et al., 2018). Nas folhas, os sintomas apresentam-se como pontos escurecidos, muitas vezes com um halo clorótico amarelo, resultado da multiplicação da bactéria e encharcamento

do tecido vegetal (BEHLAU; BELASQUE JUNIOR, 2014). Posteriormente, os sintomas evoluem para pústulas salientes de coloração cinza ou marrom-claro. Com o avanço da doença, essas lesões tornam-se maiores, circulares, mais escuras, ásperas ao toque, podendo atingir mais de um centímetro de diâmetro (BEHLAU; BELASQUE JUNIOR, 2014). Em caso de infecções mais severas, podem ocorrer desfolha e queda prematura do fruto, reduzindo a produtividade das árvores afetadas (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; DAS, 2003; FAVARO et al., 2017; SUNNY; GANDHI, 2018). Já em ramos, os sintomas são semelhantes aos observados em folhas e frutos (BEHLAU; BELASQUE JUNIOR, 2014) (Figura 2). O cancro cítrico é altamente infeccioso e pode ser espalhado rapidamente por chuvas com vento, equipamentos de colheita, pessoas que trabalham no campo, movimentação ou exposição de plantas ou partes infectadas, o que torna difícil sua erradicação (SUNNY; GANDHI, 2018).

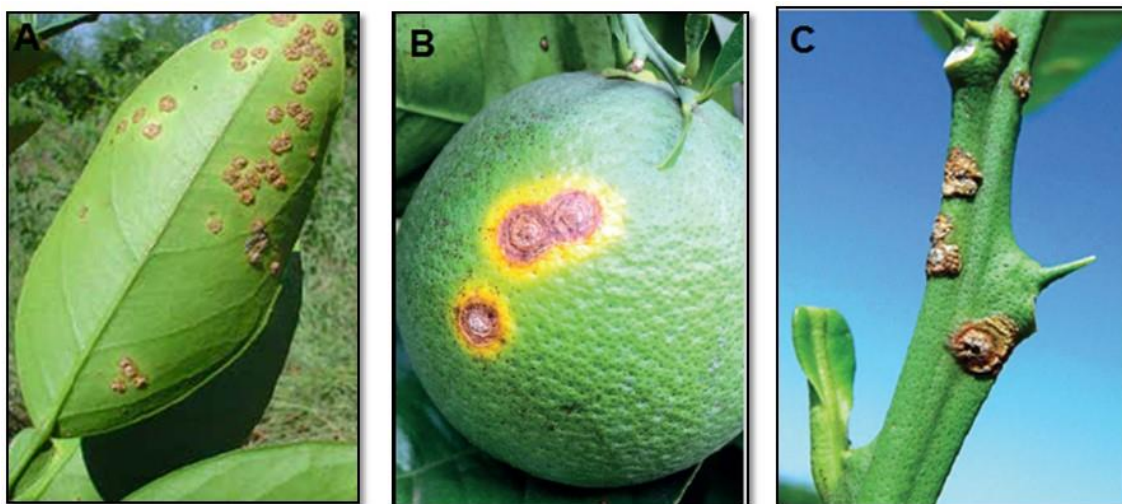


Figura 2. Sintomas de cancro cítrico em folhas (A), frutos (B) e ramos (C) de laranja.

Fonte: Behlau, Sala e Bassanezi (2017).

No cancro cítrico, como em outras doenças bacterianas, o patógeno invade os tecidos mesofílicos da planta hospedeira através de aberturas naturais (estômatos e hidatódios) ou de ferimentos mecânicos (BROW, 2001; VOJNOV et al., 2010). Ao adentrar nos tecidos vegetais, a XccA ativa a expressão de genes ligados à patogenicidade e virulência, promovendo a multiplicação e o desenvolvimento bacteriano nos espaços intercelulares (CARVALHO, 2006). A bactéria também pode

Nas últimas décadas, diversas abordagens moleculares foram propostas para o estudo de virulência e patogenicidade da XccA. Tais como técnicas de genômica funcional, que têm sido amplamente empregadas para investigar a interação dessa bactéria com seus diversos hospedeiros, com o objetivo de testar genes reconhecidamente relacionados com a patogenicidade e buscar novos genes alvos que possam elucidar o mecanismo de interação planta-patógeno.

2.3 Sistema de dois componentes (TCS)

Os sistemas de dois componentes (TCSs) são mecanismos de transdução de sinal muito comum em procariotos que permitem a esses micro-organismos desencadear respostas adaptativas aos estímulos ambientais, principalmente por meio de mudanças na expressão gênica (BEIER; GROSS, 2006). A versão mais recente do banco de dados de sistemas de dois componentes de procariotos (P2CS) contém um total de 164.651 proteínas pertencentes a TCSs, identificadas a partir de 2.758 genomas de procariotos sequenciados (ORTET et al., 2015). Os TCSs também foram detectados em vários eucariotos, incluindo plantas, leveduras, fungos e protozoários, embora em número muito menor. Foi observada uma significativa relação entre o número de TCSs e o tamanho do genoma; genomas maiores tendem a codificar mais TCSs (BEIER; GROSS, 2006). Em geral, um TCS consiste em uma proteína sensora (histidina quinase ou HK) e seu correspondente regulador de resposta (RR). Como cada TCS é especializado para responder a um sinal ambiental específico (pH, níveis de nutrientes, pressão osmótica, estado redox, proteínas de “quorum-sensing” e antibióticos), diversos TCSs podem estar presentes em uma única célula bacteriana (TIWARI et al., 2017).

A bioquímica básica dos TCSs é bem definida. Uma histidina quinase típica do sensor que contém dois domínios: um domínio de entrada N-terminal variável e um domínio C-terminal conservado que interage com o RR. Por sua vez, o RR contém um domínio receptor N-terminal conservado e um domínio de saída C-terminal variável (NIXON; RONSON; AUSUBEL, 1986; BIJLSMA; GROISMAN, 2003; BOURRET; SILVERSMITH, 2010; CHEUNG; HENDRICKSON, 2010; GROISMAN, 2016; GISLASON et al., 2017). Quando estimulada, a proteína sensora catalisa a

autofosforilação em um resíduo de histidina conservado usando adenosina trifosfato (ATP). Esse grupo fosforil de alta energia é, então, movido para um resíduo de aspartato conservado do RR, que tem sua capacidade de ligação ao DNA alterada (BIJLSMA; GROISMAN, 2003, CHEUNG; HENDRICKSON, 2010; TIWARI et al., 2017) (Figura 4).

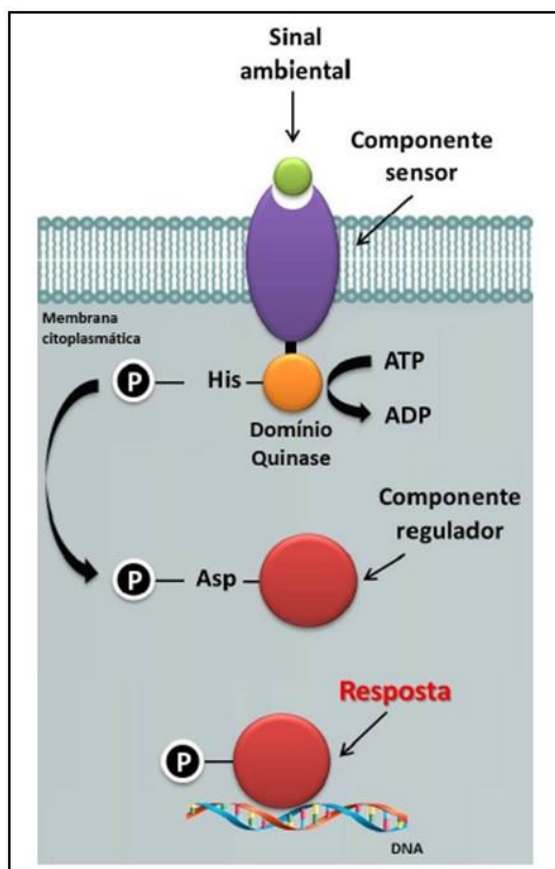


Figura 4. Esquema geral do controle da expressão gênica por um sistema de dois componentes (TCS) bacteriano. P = fósforo; His = histidina; Asp = aspartato; ATP = adenosina trifosfato; e ADP = adenosina difosfato.

Fonte: Costa (2015).

Em XccA, investigações baseadas em genômica comparativa permitiram identificar 114 genes relacionados aos TCSs (QIAN; HAN; HE, 2008; YAN; WANG, 2011; JALAN et al., 2014). Como há evidências de que os TCSs desempenhem papéis cruciais em múltiplas funções celulares da XccA (YAN; WANG, 2011), é possível que alguns desses genes possam estar envolvidos em mecanismos de patogenicidade dessa bactéria. Um desses genes é o *hrpG* que juntamente com o

hrpX são responsáveis pela regulação dos genes *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity” ou resposta de hipersensibilidade e patogenicidade) que codificam o sistema de secreção tipo 3 (SST3) na XccA (YAN; WANG, 2012; JALAN et al., 2014), considerado um dos principais fatores de virulência em muitas bactérias patogênicas (LI et al., 2010; GUO et al., 2011). Coletivamente, os genes *hrpG* e *hrpX* da XccA regulam todos os 24 genes do SST3 e 23 genes efetores do SST3 (GUO et al., 2011; FERENCE et al., 2018).

2.4 Sistema regulador de nitrogênio (NTR)

O metabolismo do nitrogênio, na maioria das proteobactérias, é controlado pelo sistema regulador de nitrogênio (NTR). As principais proteínas envolvidas nesse sistema são: as enzimas bifuncionais GlnD (uridil transferase (UTase) e/ou de remoção de uridil (UR) e GlnE (adenil transferase [ATase] e/ou remoção de adenil (AR); as proteínas triméricas (PII), codificadas por *glnB* e *glnK*; o sistema regulador de dois componentes, produto dos genes *ntrB* e *ntrC*, constituído pela proteína histidina quinase (NtrB) e pelo regulador de resposta (NtrC) e a enzima glutamina sintetase, produto do gene *glnA* (MERRICK; EDWARDS, 1995; ARCONDEGUY et al., 2001; ZHANG; POHLMANN; ROBERTS, 2005).

Em *Escherichia coli*, na qual o sistema NTR é bem compreendido, em condições limitantes de nitrogênio, a proteína GlnD transfere um grupamento uridina monofosfato (UMP) para a proteína trimérica PII. A PII uridilada (PII-UMP) não interage com a NtrB, de modo que esta, na forma livre, tem atividade de quinase e catalisa sua autofosforilação. Em seguida, NtrB transfere o grupo fosforil à proteína NtrC, que, então, atua como um ativador transcricional de genes envolvidos na assimilação de amônia e no metabolismo do nitrogênio, como *glnA* que codifica a glutamina sintetase (ZHANG et al., 1995; JONSSON; NORDLUND, 2007), bem como de promotores dependentes de σ^{54} (rpoN) regulados por carência de nitrogênio (LIU et al., 2017). Porém, em condições suficientes de nitrogênio, a GlnB é desuridilada e interage com NtrB, estimulando a desfosforilação de NtrC, que fica inativa (JONSSON; NORDLUND, 2007).

A atividade da glutamina sintetase (GS) também responde aos níveis de nitrogênio disponíveis (JONSSON; NORDLUND, 2007). Assim, em baixos níveis de

nitrogênio, a enzima adenil transferase, codificada pelo gene *glnE*, catalisa a remoção de grupos de adenosina monofosfato (AMP) da GS, levando-a a uma atividade enzimática mais ativa. Por sua vez, em condições de alto nível de nitrogênio, a proteína GlnB não modificada estimula a atividade de adenilação da GlnE e, conseqüentemente, a inativação da GS (Figura 5) (JONSSON; NORDLUND, 2007).

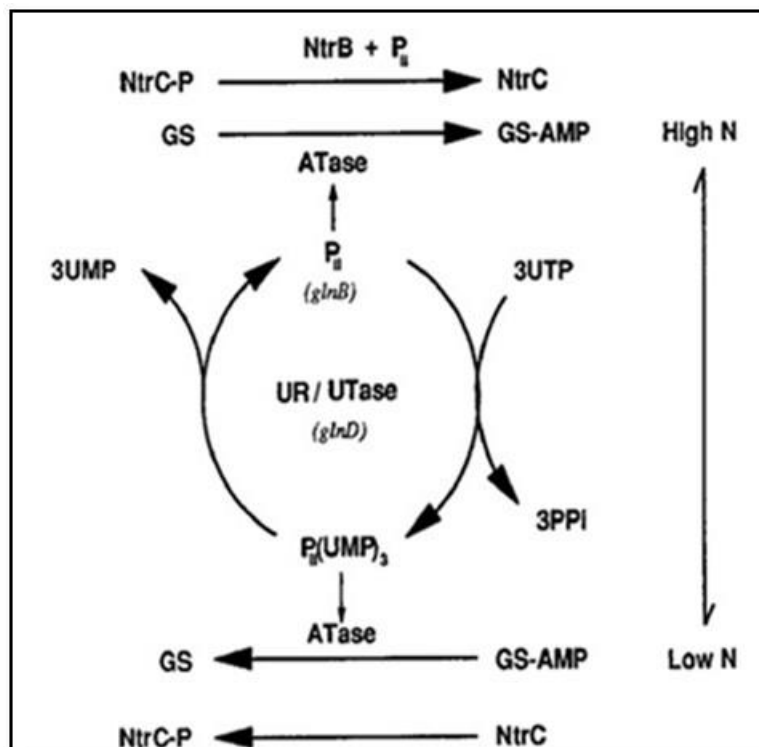


Figura 5. Modelo esquemático para a regulação das atividades das proteínas glutamina sintetase (GS) e NtrC em resposta ao nível de nitrogênio. A adenil transferase (UTase), produto do gene *glnD*, catalisa a uridilação e desuridilação da proteína trimérica PII, produto de *glnB*. ATase catalisa a adenilação e desadenilação de GS. A proteína NtrB catalisa a fosforilação e desfosforilação da NtrC.

Fonte: Merrick e Edwards (1995).

O fator sigma σ^{54} é um regulador central em muitas bactérias patogênicas e tem sido associado a uma multiplicidade de processos celulares, por exemplo, assimilação de nitrogênio e características funcionais importantes, como motilidade, virulência e formação de biofilmes (FRANCKE et al., 2011). O fator sigma σ^{54} associa-se reversivelmente ao núcleo RNA polimerase e reconhece suas sequências de promotores cognatos por meio de sequências consenso definidas nas

posições -12 pb e -24 pb em relação ao sítio de início da transcrição (LIU et al., 2017).

O início da transcrição dependente de σ^{54} normalmente requer interação com uma proteína de ligação potenciadora (EBP). A proteína específica envolvida varia de acordo com os respectivos sinais ambientais. A NtrC é a EBP no caso de condições de limitantes de nitrogênio (BUSH; DIXON, 2012; LIU et al., 2017).

As EBPs compartilham uma estrutura modular conservada que consiste em três domínios: 1) um domínio regulador amino-terminal, 2) um domínio catalítico central que pertence à superfamília AAA+ de ATPases e é necessário para interação com σ^{54} e 3) um domínio carboxi-terminal de ligação ao DNA com um motivo de hélice-volta-hélice que é necessário para o reconhecimento de sequências de ativação “upstream” (STUDHOLME; DIXON, 2003). A EBP catalisa a hidrólise de ATP e, desse modo, promove a conversão do promotor fechado em um complexo de promotor aberto a partir do qual a transcrição pode prosseguir (MORRIS et al., 1994; STUDHOLME; DIXON, 2003; LIU et al., 2017).

2.5 Mutagênese sítio-dirigida por PCR

A mutagênese sítio-dirigida por PCR é uma técnica molecular empregada para gerar mutantes com sequências de nucleotídeos alteradas em estudos enzimáticos, investigação da relação entre estrutura e funções de proteínas e análise funcional de genes ou suas sequências reguladoras (XIAO et al., 2007; LU et al., 2009; HUSSAIN; CHONG, 2016). Essa técnica permite substituir, adicionar e excluir sequências de bases específicas de DNA ou genes alvo com precisão, com a introdução ou não de sítios de restrição (URBAN; NEUKIRCHEN; JAEGER, 1997; LEE et al., 2010; HUSSAIN; CHONG, 2016).

Os métodos de mutagênese sítio-dirigida por PCR são vantajosos por serem rápidos e muito eficientes; dentre eles, destaca-se a PCR de extensão por sobreposição (OE-PCR), notável por sua simplicidade e eficiência em mutagênese em vários locais (HUSSAIN; CHONG, 2016). Essa técnica consiste em deletar um gene alvo por meio de duas etapas de PCR (LEE et al., 2010). A primeira etapa é chamada de PCR primária e a segunda, de PCR secundária ou de ligação (LEE et al., 2004).

Para a mutagênese por deleção, são sintetizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, A-B e C-D, que são desenhados com base na sequência a ser deletada. Os oligonucleotídeos B e C são chamados de quiméricos e os A e D, não quiméricos. A sequência dos dois oligonucleotídeos quiméricos é derivada parcialmente da sequência do molde a ser amplificado e parcialmente dos fragmentos a serem recombinados após a eliminação do gene de interesse (LEE et al., 2004). Os oligonucleotídeos quiméricos são especificamente confeccionados para conter 18 nucleotídeos derivados da sequência do molde e nove derivados do fragmento a ser recombinado, chamados de cauda completar (LEE et al., 2010). A cauda do oligonucleotídeo B é constituída pelas nove primeiras bases reversas complementares do oligonucleotídeo C, enquanto a cauda do oligonucleotídeo C é formada pelas últimas nove bases do oligonucleotídeo B, conforme Figura 6.

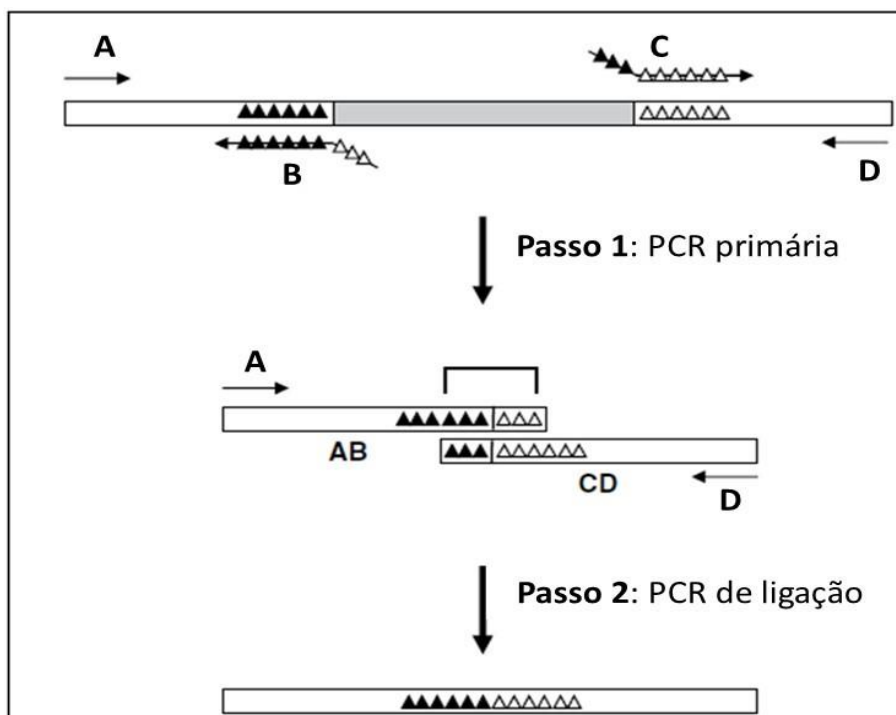


Figura 6. Diagrama esquemático de um protocolo de mutagênese de deleção sítio-dirigida por PCR de extensão por sobreposição. Inicialmente, dois produtos de PCR que representam as regiões de flaqueamento da sequência a ser eliminada são preparados com um iniciador não quimérico e um iniciador quimérico: A e B ou D e C, respectivamente. No segundo passo, são utilizados dois produtos de PCR (AB e CD) como molde para PCR de ligação com o par de iniciadores mais externo (A e D). A sequência a ser excluída é denotada pela cor cinza, enquanto as regiões flanqueadas são indicadas por triângulos (pretos ou brancos).

Fonte: Lee et al. (2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Mutagênese sítio-dirigida por PCR dos genes *ntrB* e *ntrC*

3.1.1 Desenho dos oligonucleotídeos

Para a obtenção dos mutantes $\Delta ntrB$ ($\Delta XAC_RS01085$) e $\Delta ntrC$ ($\Delta XAC_RS01090$) foi utilizada a técnica de mutagênese sítio-dirigida por PCR de extensão por sobreposição (“site directed mutagenesis by PCR overlap extension”). Nas Tabelas 1 e 2, são apresentados os tamanhos dos fragmentos (“amplicon”) e os oligonucleotídeos A, B, C e D que foram desenhados manualmente a partir das sequências de nucleotídeos dos genes *ntrB* e *ntrC*.

Tabela 1. Tamanho dos fragmentos (“amplicon”) e sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a obtenção do mutante $\Delta ntrB$.

Nome do oligonucleotídeo*	Sequência 5'→3'**	“Amplicon” (pb)
A(F)	GCCGGATCGAACCTGGAAGCCAATGCC	788
B(R)	GCAGGGTGAACGCGAAGCGTGCGTTG	
C(F)	CTTCGCGTTTCACCCTGCTGCTGCCCG	855
D(R)	GAAGAATTCGTTCTCTGCCAACACGCGCAGC	
A(F)	GCCGGATCGAACCTGGAAGCCAATGCC	1.643
D(R)	GAAGAATTCGTTCTCTGCCAACACGCGCAGC	

(F): sequência do oligonucleotídeo direto (“Forward”); (R): sequência do oligonucleotídeo reverso (“Reverse”).

*Oligonucleotídeos sintetizados pela Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

**As sequências em verde e em vermelho dos oligonucleotídeos A e D correspondem, respectivamente, aos sítios de restrições das enzimas *BamHI* e *EcoRI*; a sequência em azul corresponde à sequência reversa complementar das nove primeiras bases do oligonucleotídeo C e a em cinza, à sequência das últimas nove bases do oligonucleotídeo B.

Tabela 2. Tamanho dos fragmentos (“amplicon”) e sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a obtenção do mutante *ΔntrC*.

Nome do oligonucleotídeo*	Sequência 5'→3'**	“Amplicon” (pb)
A(F)	TAT AAGCTT AACTGCGCAATCCGCTGGCC	677
B(R)	AGACCCAAAT CAGCCATGCAGATGCTCCTG	
C(F)	CATGGCTG ATTTGGGTCTAACGCCCTG	787
D(R)	CGG GGATCC CACGCAGATTGTCCATAT	
A(F)	TAT AAGCTT AACTGCGCAATCCGCTGG	1.446
D(R)	CGG GGATCC CACGCAGATTGTCCATAT	

(F): sequência do oligonucleotídeo direto (“Forward”); (R): sequência do oligonucleotídeo reverso (“Reverse”).

*Oligonucleotídeos sintetizados pela Integrated DNA Technologies (IDT).

**As sequências em verde e em vermelho dos oligonucleotídeos A e D correspondem, respectivamente, aos sítios de restrição das enzimas *HindIII* e *BamHI*; a sequência em azul corresponde à sequência reversa complementar das nove primeiras bases do oligonucleotídeo C e a em cinza, à sequência das últimas nove bases do oligonucleotídeo B.

Com o intuito de facilitar a subsequente reação de clonagem das sequências de DNA da XccA 306, obtidas por reações de PCR, na região “polylinker” do vetor suicida pNPTS138, os oligonucleotídeos A e D foram desenhados com os sítios de restrição das enzimas *BamHI* e *EcoRI* para o gene *ntrB* e *HindIII* e *BamHI* para o gene *ntrC*, que correspondem as mesmas enzimas que foram usadas para digerir posteriormente esse vetor. O vetor suicida pNPTS138 possui um gene de resistência à canamicina, outro que codifica a enzima b-galactosidase (LacZ) e mais um de sensibilidade à sacarose (SacB) (Figura 7). Esses genes são importantes para as etapas seguintes, durante a realização do processo de seleção das colônias bacterianas transformadas com o vetor pNPTS138.

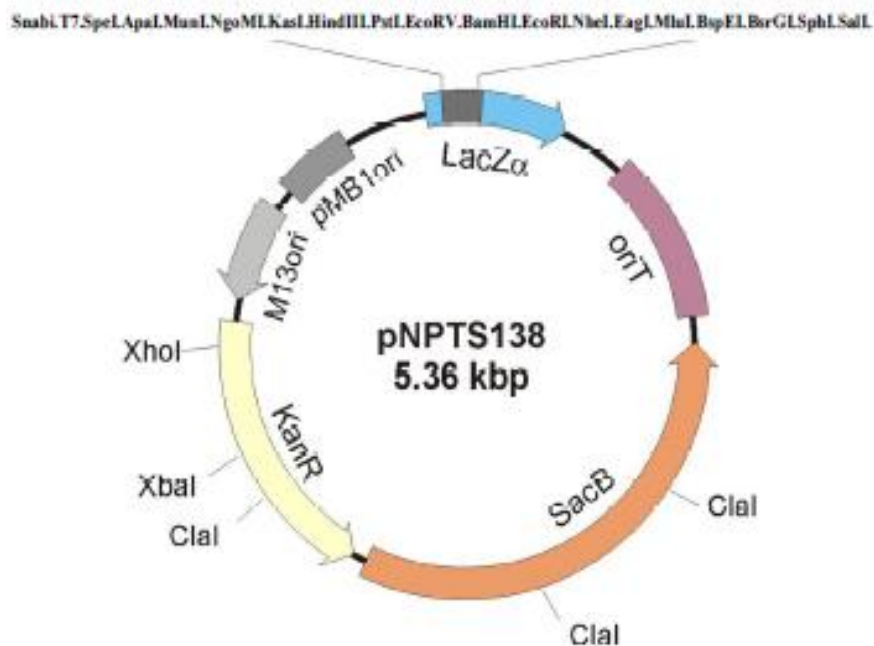


Figura 7. Mapa genômico circular do vetor suicida pNPTS138.

Fonte: Cappelletti (2010).

Neste estudo, foram eliminados 997 pares de base da região de interesse pertencentes ao gene *ntrB* e 1.420 pares de base da região de interesse pertencentes ao gene *ntrC*, os quais possuem, respectivamente, 1.056 e 1.428 pares de base na XccA 306. As Figuras 8 e 9 ilustram as sequências nucleotídicas desses genes, em formato FASTA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com a indicação da localização exata dos oligonucleotídeos e as respectivas regiões deletadas.

>NC_003919.1:253796-256481 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306,
complete genome

```

GCCGGTTCCAACCTGGAAGCCAATGCCGGTGGCGCTGGCCTTCCTCAACACCTTGCTGGCCACTGCCGCTG
CCATCCTGGGCTGGTTCGCTGACCGAGAAGATCATCAAGGGCAAGTCGTCCGCCCTGGGCGTGGCCTCGGGCAT
GGTGGCCGGGCTGGTGGCATCACCCGGGCTGCCGCACGGTGGGCCGTTGGCGCGATCGTCATTGGTCTG
GCGGCCGGCGTACTGTGCGTGTGGGGCGTCACCGGCCTGAAGCGCCTGTTGGGCGCGGACGACAGCCTGGACG
TGTTCCGGCGTGCATGGCCTGGGCGGCATCATCGGCGCCATCCTGACCGGTGTGTTCTCGGCGGCCTCGCTGGG
CGGCCAGAAGGGCGGCGATTACGACATCGTCCACCAGGTGGCATCCAGGCGCTGGGCGTGGGATCACGGTC
GGCTGGATCGGCGTGGTGTGGTGGTGGGTTTCGTGGTTGCCAAGCTGGTGTTCGGCCTGGCGGTGAGCGAAG
AAGCCGAGCGCGAGGGCCTGGACATCACCTCGCACGGCGAAGCCGCGTACGAGTCGTGAGCATGCACACCCGC
GGCCGCGCTGCCGCGGGTGGCGCAACGACCCGGCCGGAACGCCAGCCGGGTCCGTTTTCCCCCGTCGCCCCG
TTGGGCGCGGAACCACTGCCAGGTGCCTGCATGACCAGCCCCACGCCCGTACTGCCGCGCGGATGCACGC
TGGAGCGGTGCCCGCCGCGCGCTGTGGCCAGCATTGTTTCAACGCACGCTTCGCGGTTGCGCGCATCCGCGC
ATTCCCATTCGTGTTGCACTAAATTGGTGCAATGGTGACGTCCTCTTCCATGCCATCGCTGGACAGCCTGGGC
ACACCGGTTCGCTGGGCGGACCGCGAGGGCGCGTGTGGGCGTCAACCCGGCGTTTGCCTGGCTCGGGG
TCAGTGACAGGCGGTTGGTTCGAACAGCCCTGGCCGCGCTGGAAGTGCAGGCGATGCGCTGGCGCGCTTCCT
GCTCAACGACGAGCGCGACATATTGCGTCTGCACCGGTGGCGCTGGGCTGCCAACGACGCGCGCGCTTT
GCCGAAGGCTGGCTGTGCGGCTGGACGATGGCGGTGGTGTGCTGGAACCCACCCGGTCGACGAATTCCCCG
CGCTCGATCCACCCACGCCCTGCCAACGCCCTTGAGCGCTGCGCTCAAAGGTTGGCGCACGAAGTGCACAA
TCCGCTGGCCGGGTGAAGGGCGCGCGAGCTGCTGGCACGCCGCGCGCGCGGCGCGACGAAGACGAACGC
GAGCTGATCGAGCTGATCGGCACCGAGATCGAGCGCCTCAATACCTTGCTCGAACGGCTGCTGTGCCCCACCC
CGCGCGGCCCGCACGACCGCCTCAACATCCATGTGGTGTGCTGGAACGGGTGTTGCGCCTGGCCGAAGCCGAGGG
CGGCTGGTGGTGCAGGTGCAGCGGACTACGACCCAGCATTCCCGACATTCTGGGCGATGGCGACCGCCTG
ACCCAGGCGGTCTGGAACCTGGTGCCTAACGCCTTCAGGCCGGCGCCACGCGCGTGACGCTGCGCACCCGCG
TCGAGCATGGCCAGCGCATCCGCGACCGCGTGCATGCGATGTCGCTGCGGTGGAAATCATCGACGACGCGCG
CGGCGTGCCGGAAGAACTGGCCGAGCACCTGTTTCTGCCACTGGTCAGCGGCCGCGCGGAAGGCAGCGGGCTG
GGCCTGGCGCTGGCCAGCAGGTCTCGCGCGAACACCACGGCACGCTGACCTATCGCTCGCGTCCGGGCCATA
CCGTTTTACCCCTGCTGCTGCCGAGCTGGCCGGCGATCACGACAAGGAGCATCTGCATGGCTGAGACCGCG
CCGATCCACATCTGGGTGGTTCGACGACGACCGGTGGTCCGTTTCGTGCTGTCCACCGCCTTGCGCGATGC
CGGCTACGCCGTGGACGGCTTCGACAGCGCGCTGCCGCGCTGCAGGCGCTCGGCATGCGGCCACGCCGGAT
TTGCTGTTTACCGACGTGCGCATGCCCGCGAAGACGGCTGACCCTGCTCGACAACTCAAATCCAAACACC
CGCACTTGCCGGTGATCGTGATGTCGGCCTATACCGACGTTGCCAGCACCGCGGTGCCTTCCGCGGCGCGC
GCACGAGTTCCTGTCCAAGCCGTTGACCTGGACGACGCGGTGGCACTGGCTGCGCGCGCGCTGCCGGACGCC
GATGCCGCGCTCGAAGAAATCGTCGCCACGCGCTGGCCGAGGGCTCGGCCTCGTTGATCGGCGACACGCCCG
CGATGCAGGCCTTGTTCGCGCGATCGGACGCTGGCGCAGGCGCGCTGTGCGGTGCTGATCAATGGCGAAAC
CGGTACCGGCAAGGAGTTGGTTCGCGCGCGCTTGACAAACGAATCCCGCGCGCGCGCAAAACCTTCTGTCGCG
CTCAACACCGCGCCATCCCGGCCGAATTGCTGGAAGCGAGTTGTTTCGGCCACGAAACCGGCGCGTTACCGG
GGGCGACCAAACGGCATATCGGCCGCTTGAACAGGCCGATGGCGGCACGCTGTTTCTGGACGAAATCGGCGA
CATGCCGTTGCCGCTGCAGACCCGCTGCTGCGCGTGTGGCAGAGAACGAATTCTTC

```

Figura 8. Localização dos oligonucleotídeos A-B e C-D e sequência de nucleotídeos em formato FASTA do gene *ntrB* presente no banco de dados “Genbank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A região e a direção dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão representadas pelas setas em azul, laranja, roxo e vermelho, respectivamente. A sequência de nucleotídeos delimitada pelo retângulo em linha preta corresponde à sequência do gene *ntrB*.

>NC_003919.1:254630-258083 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306,
complete genome

```
CGCCCTGCCCAACGCCCTTGAGCGCTGCGCTCAAAGGGTTGGCGCACGAAGTGGCGAATCCGCTGCCCGGG
CTGAAGGGCGCCGCGCAGCTGCTGGCAGCGCCGCGCGGGCGGGCGCGACGAAGACGAACGCGAGCTGATCG
AGCTGATCGGCACCGAGATCGAGCGCCTCAATACCTTGCTCGAACGGCTGCTGTGCCCCACCCCGGCGCG
CCCGCACGACCGCCTCAACATCCATGTGGTGCTCGAACGGGTGTTGCGCCTGGCCGAAGCCGAGGGCGGG
TGGTGGTGAGGTGCAGCGCGACTACGACCCAGCATTTCCGACATTTCTGGGCGATGGCGACCGCCTGA
CCCAGGGCGGTCTGGAACCTGGTGCGTAACGCCCTTCCAGGCCGCGCGCCACGCGCGTGACGCTGCGCACCCG
CGTCGAGCATGGCCAGCGCATCCGCGACCGCGTGTCATGCGATGTGCTGCGGCTGGAAATCATCGACGAC
GGCGGGCGCGTGCCGGAAAGAACTGGCCGAGCACCTGTTTTCTGCCACTGGTCAGCGGCCGCGCCGAAGGCA
GCGGGCTGGGCTGGCGCTGGCCGAGCAGGTCTCGCGCGAACACCACGGCACGCTGACCTATCGCTCGGG
TCCGGGCCATACCGTTTTTCAACCTGCTGCTGCCCCGAGCTGGCCGCGCATCACGACAAGGAGCATCTGCAT
GGCTGAGACCGCGCCGCTATCCACATCTGGGTGGTTCGACGACGACCGGTCCGTTTCTGCTGCTGTCC
ACCGCCTTGCGCGGATGCCGGCTACGCCGTGGACGGCTTCGACAGCGCCGCTGCGAGCGCCGCTGCAGGCGCG
GCATGCGGCCCCACGCCGATTTGCTGTTTCAACGACGTGCGCATGCCGCGCGAAGACGGCCTGACCCCTGCT
CGACAAACTCAAATCCAAACACCCGCACTTGCCGGTGATCGTGATGTGCGCCTATACCGACGTTGCCAGC
ACCGCCGGTGCTTCCGCGCGCGCGCGCACGAGTTCTGTCCAAGCCGTTTCGACCTGGACGACGCGGTGG
CACTGGCTGCGCGCGCGCTGGCCGACCGCGATGCCGCGCTCGAAGAAATCGTCGCCACGCGGCTGGCCGA
GGGCTCGGCCTCGTTGATCGGCGACACGCCCGCGATGCAGGCCCTTGTTCGCGCGCATCGGACGCCCTGGCG
CAGGCGCGCGCTGTGCGTGCTGATCAATGGCGAAACCGGTACCGGCAAGGAGTTGGTCGCGCGCGCGCTTGC
ACAACGAATCCCCGCGCGCGCGCAAACCCCTTCGTGCGCTCAACAACCGCCGCCATCCCCGGCCGAATTGCT
GGAAAGCGAGTTGTTTCGGCCACGAAACCGCGCGCTTACCGGGGCGACCAAACCGGCATATCGGCCGCTTC
GAACAGGCCGATGGCGGCACGCTGTTTTCTGGACGAAATCGGCGACATGCCGTTGCCGCTGCAGACCCGCC
TGCTGCGCGTGTTGGCAGAGAACGAATTCCTCCGCGTTGGTGGCGCGAATTGATCCGCGCTCGATGTGCG
CGTGATCGCCGCCACCCACAGGACCTGGAGGCGCTGGTTCGAACAAGGCCGCTTCCGCGCCGATCTGCTG
CACCGCCTGGATGTGGTGCGCCTGCAATTGCCGCGCTGCGCGAACGCGCGCGCGACATCGCGCAACTGG
CCGAAAATTTCTTGCCATGGCCGGGCGCAAACCTCGACATGCTGCCCAAGCGGCTGTGCTCGGCCGCGCT
GGAAGACCTGCGCCAGTACGACTGGCCCGGCAACGTGCGCGAACTGGAAAACGTGTGCTGGCGCCTGGCG
GCGCTGGCGACCTCGGACATCATCGACGTGGTCGACGTGGACGCGGCACTGGCGCGCGCGCGCGCGCTGCT
ACCGCAGCGGTGCGCAGCGATGGGCGAGTGGGACGACATGCTTTCCAGCTGGGCGCGCAACGCCCTGAGCGA
AGGTGCCCAGGGCCTGCACGCGGAAGCGCGGAGCGCCTGGACAGGACCTTGCTCGAAGCGGCTTGCAA
CTCACCCAGGGCGCGCGCGCGCGAAGCTGCCGCGCGCTGGGCTGGGCGCAACACGGTCAACCGCAAC
TCGGCCCCGGGCGCAAAUGTCTGCTGATTTGGGTCTAACGCCCTCTCCCATGAGAGAGGGGTGGGGTGA
GGTGCCCTGTGCTGTGCCGATGCAAGCGCGACTGCACGCGCACCGATCCAAACGAGGCCTTGATCGAGCC
GAGCCTGCCCGACATTTGCCCGCGCAAGCGTCGATGCGTGGCACGCGCGCGCATCCGGTGGCTGTGATA
ACGCCACCGCAGCCCTGCCGTGCCGACGCGCGTCTGCCAGGCAAGTTCGCACCGTGCCTGGCGCGCGCACA
CCATCTGGCAATCCGACCCAGCACACCAACCCGTAACCTCCTGCGCTGCCAGCGGCTGCATTTTCATGAC
ACGTGAACATGCGCCCGCATAGGTTTTCCAGCCTGATCAGGAGAATGCTCGATGCGTTACCGGTCGCCCCA
CGATCGTTGCCCTCACCGCGCTGGCGCTGGCGCGCTGCAGCAGCAAGCGCGCGCGCGCCCAAGCGCGCTCC
GGCGCCAGCGCGCGCGGTGGTGCTGCGCGCGCGGTGCAGCAAGCCGAGGCTGCGCTGGCATCTGCCCTCG
GGCAGCCTGGTCAGCGGTGCGGTGGTGCTGGTGCGCGCGCTACAGGGTATCCGCCTCACTGGCACCATCG
GCGGCTTGCGCGCGCGCGGTGTGTCCGATTCCATGTGCACGAACGCGCGCATTCAGCGCGCGCGCATGC
CAGCAGCGCGCGCGCGCATTTCAACCCGGGTGGTGCGCTGCACGGCGGTGCCGCGCGCGCGCGCGCATCAT
CTGGGCGATATGGACAATCTGCGTGCAGACGCCGAAGGCGTGGTGATCTGGACATGATTCTGTCCGGCA
TCAGTCTGGGCGACCGCGCTCCGACGGATGTGATCGGCAATCGCTGATCGTGATGCCGACCCCGACGA
CTATCGCAGCCAGCCAGCGCAATGCCGCTGCGCGCTGGCCTGCGGCGTCATTGCGCTCACCCAATGG
GGCACGCCCCCTTCGACGCCCTGA
```

Figura 9. Localização dos oligonucleotídeos A-B e C-D e sequência de nucleotídeos em formato FASTA do gene *ntrC*, presente no banco de dados “Genbank” do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A região e a direção dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão representas pelas setas em azul, laranja, roxo e vermelho, respectivamente. A sequência de nucleotídeos delimitada pelo retângulo em linha preta corresponde à sequência do gene *ntrC*.

3.1.2 Obtenção dos fragmentos A-B, C-D e A-D por PCR

O cosmídeo 0OB11, proveniente da biblioteca da XccA 306 (DA SILVA et al., 2002) e que se encontrava armazenado em freezer a -80°C , no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Unesp/FCAV, foi utilizado como “template” para amplificação dos fragmentos A-B, C-D e A-D, visando à deleção dos genes *ntrB* e *ntrC*. Para tanto, uma alíquota do cosmídeo 0OB11 foi cultivada em meio de cultura sólido LB (Luria-Bertani: 10 g L^{-1} de triptona, 5 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de cloreto de sódio e 15 g L^{-1} de ágar, pH 7,0) contendo o antibiótico canamicina ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), a 37°C por 16 horas, em estufa bacteriológica.

A seguir, preparou-se um inóculo usando uma colônia isolada, obtida a partir do cultivo, e 5 mL de meio de cultura líquido LB (10 g L^{-1} de triptona, 5 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de cloreto de sódio, pH 7,0) com antibiótico canamicina ($50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), o qual foi incubado a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm . O DNA cosmidial foi extraído e purificado com o “kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, e quantificado com o espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Scientific”).

As reações de PCRs primárias para a obtenção dos fragmentos A-B e C-D foram preparadas separadamente para cada par de oligonucleotídeo (A-B e C-D). Cada reação consistiu em 50 ng de DNA cosmidial, $0,2\text{ mM}$ de cada dNTP, $0,4\text{ U}$ de “Phusion® High Fidelity DNA Polymerase” (“Thermo Scientific”), 1 X do tampão da enzima, $0,5\text{ }\mu\text{M}$ de cada oligonucleotídeo iniciador, $5,0\%$ de DMSO (Dimetilsulfóxido) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de $20\text{ }\mu\text{L}$. O material resultante das reações foi amplificado em termociclador “Veriti® 96-Well Thermal Cycler” (“AB Applied Biosystems”), no qual as amostras foram inicialmente submetidas à desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguida por 30 ciclos de amplificação. A cada ciclo, as amostras sofreram em cadeia as etapas de desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 72°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os ciclos de reação, o processo foi encerrado com uma extensão final a 72°C por 10 minutos, seguida de resfriamento a 4°C .

A confirmação da amplificação dos produtos das reações de PCR foi realizada por meio de corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0%, corado com 10 mg mL⁻¹ de brometo de etídio, com tampão de TBE (Tris-Borate-EDTA: 54 g L⁻¹ de Tris base, 27,5 g L⁻¹ de ácido bórico, 20 mL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0) a 0,5 X. Os fragmentos amplificados foram visualizados, quando exposto à luz ultravioleta, e fotodocumentados no equipamento Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ (“Bio-Rad”). Os fragmentos obtidos a partir das PCRs primárias foram purificados com o uso do “kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Scientific”).

Os fragmentos A-B e C-D purificados foram utilizados como “template” na PCR de ligação, seguindo as condições da PCR primária, com algumas modificações. As reações foram realizadas usando 50 ng de DNA tanto do fragmento A-B quanto do C-D e os oligonucleotídeos A e D. A amplificação dos segmentos A-D foram verificadas por eletroforese em gel de agarose (1,0%), e as bandas com tamanhos correspondentes ao esperado (A-DntrB = 1.643 pb e A-DntrC = 1.446 pb) foram cortadas, com auxílio de um bisturi, e purificadas com o “kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), segundo as instruções fornecidas pelo fabricante. Por fim, foi feita a quantificação dos DNAs purificados no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Scientific”).

3.1.3 Reação de digestão com endonucleases de restrição dos fragmentos A-DntrB e A-DntrC e clonagem no vetor suicida pNPTS138

Inicialmente, submeteu-se 0,2 µg do fragmento A-DntrB purificado a uma reação de digestão dupla contendo 10 U da enzima “FastDigest®” *BamHI* (“Fermentas”), 10 U da enzima “FastDigest®” *EcoRI*, 1 X do tampão de digestão “FastDigest Buffer” (“Fermentas”) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37°C por 15 minutos, e as enzimas foram inativadas por desnaturação em banho-maria a 80°C por 5 minutos. O produto proveniente da reação de digestão foi separado em gel de agarose “low-melting” a 1,0% com 10 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo; e a corrida eletroforética foi realizada com tampão TBE a 0,5 X. A banda correspondente ao fragmento de interesse foi

recuperada do gel e purificada com o “kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, e a concentração de DNA foi determinada no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“ThermoScientific”).

Por sua vez, o fragmento *A-DntrC* foi submetido inicialmente a uma reação de digestão usando 1,0 µg do fragmento *A-DntrC* juntamente com 10 U da enzima *HindIII* (“New England Biolabs”), 1 X do tampão de digestão “NEBuffer™ 2.0” (“New England Biolabs”) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada a 37°C por 16 horas e a enzima inativada por desnaturação em banho-maria a 80°C por 5 minutos. O produto resultante da reação de digestão foi purificado com o “kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, e a concentração de DNA foi determinada no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“ThermoScientific”). A seguir, foi realizada uma segunda reação de digestão com o fragmento *A-DntrC* digerido e purificado, seguindo as mesmas condições da primeira, porém com 10 U da enzima *BamHI* (“New England Biolabs”). A reação foi incubada a 37°C por 16 horas e a enzima inativada por desnaturação em banho-maria a 65°C por 20 minutos.

O vetor pNPTS138 também foi digerido, em reações diferentes, com as mesmas enzimas de restrição usadas para digerir os fragmentos *A-DntrB* (*BamHI-EcoRI*) e *A-DntrC* (*HindIII-BamHI*). A reação de digestão do vetor pNPTS138 com as enzimas utilizadas na digestão do fragmento *A-DntrB* foi composta por 1,0 µg de DNA (vetor fechado), 10 U da enzima “FastDigest®” *BamHI* (“Fermentas”), 10 U da enzima “FastDigest®” *EcoRI*, 1X do tampão de digestão “FastDigest® Buffer” (“Fermentas”) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada e desnaturada seguindo as mesmas condições já descritas para a reação de digestão do fragmento *A-DntrB*. A outra reação de digestão do vetor pNPTS138 foi realizada com as mesmas enzimas e nas mesmas condições utilizadas para digerir o fragmento *A-DntrC*, porém usando 10,0 µg de DNA (vetor fechado), 30 U da enzima *HindIII* (“New England Biolabs”) e 10 U da *BamHI* (“New England Biolabs”).

Para a confirmação da digestão do vetor pNPTS138, os produtos das reações de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% e purificados com o “kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante, e as concentrações de DNA foram determinadas no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Scientific”).

A seguir, foram realizadas duas reações de clonagem (ligação) envolvendo o vetor pNPTS138: uma com fragmento *A-DntrB* e outra com o fragmento *A-DntrC*. As reações foram preparadas em um volume final de 10 µL compostos por 150 ng do fragmento *A-DntrB* ou *A-DntrC*, 50 ng do vetor pNPTS138 (proporção molar 1:3 de vetor/inserto), 5 U da enzima “T4 DNA ligase” (Invitrogen), 1 X do tampão de ligação e água ultrapura estéril para completar o volume total. As reações de ligação foram mantidas a 16°C por 16 horas e os produtos da ligação no vetor pNPTS138 (pNPTS138-*A-DntrB* e pNPTS138-*A-DntrC*) foram usados para posterior transformação em células de *Escherichia coli* DH10B quimicamente competentes, preparadas como descrito em Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), com modificações.

3.1.4 Transformação em células de *E. coli* DH10B quimicamente competente

A transformação celular foi feita pelo método do choque térmico. Esse método baseia-se na mudança brusca de temperatura, alterando a permeabilidade da parede celular e, assim, permitindo a entrada de DNA exógeno na célula. Para a transformação em *E. coli* DH10B quimicamente competente, 5 µL da reação de ligação foram transferidos cuidadosamente para microtubos de 1,5 mL contendo 50 µL das células competente, o conteúdo foi misturado suavemente e mantido em gelo por 20 minutos.

Após terem sido imersos em banho-maria a 42°C por 1 minuto e 30 segundos e retornados imediatamente ao gelo por 2 minutos, foram adicionados aos microtubos 950 µL de meio de cultura SOC (“Super Optimal Broth with Catabolite Repression”: 40 µL de glicose a 20% e 40 µL de cloreto de magnésio 1 M em meio SOB [“Super Optimal Brot”: 20 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 0,58 g L⁻¹ de cloreto de sódio, 0,2 L⁻¹ de cloreto de potássio, pH 7,5]). Os tubos foram mantidos a 37°C por 1 hora e 30 minutos, sob agitação de 150 rpm para

recuperação das células. Então, 200 µL de cada tubo foram plaqueados em meio de cultura LB contendo 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, 0,1 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) e 0,0032% de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) e as placas foram incubadas a 37°C por 16 horas.

Das colônias brancas e azuis obtidas na transformação após o período de incubação, somente as brancas foram selecionadas; pois o vetor que contém o fragmento *A-DntrB* ou o *A-DntrC* inserido é incapaz de clivar X-gal, produzindo apenas colônias brancas. A seguir, foram feitas reações de PCR com essas colônias procedendo-se como descrito: coletou-se uma amostra da colônia com um palito estéril, na câmara de fluxo laminar, que foi esfregada no fundo de um microtubo de 200 µL, ao qual foram adicionados 20 µL de tampão de lise (5 mL de KCl 1 M, 1 mL de Tris-HCl 1 M, pH 8,8, 100 µL de Tween 20, H₂O q.s.p. 100 mL, pH: 8,3). O material de cada reação foi incubado no termociclador “Veriti® 96-Well Thermal Cycler” (“AB Applied Biosystems”), a 99°C por 30 minutos. As reações de PCR foram compostas por 4 µL da mistura resultante da incubação (DNA), 0,2 mM de cada dNTP, 1,0 U de “GoTaq® DNA Polymerase” (“Thermo Scientific”), 1X do tampão da enzima, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (A e D), 1,5 mM de MgCl₂ e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 20 µL.

Os produtos obtidos foram amplificados em termociclador “Veriti® 96-Well Thermal Cycler” (“AB Applied Biosystems”), no qual as amostras foram inicialmente submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificação. A cada ciclo, as amostras sofreram em cadeia as etapas de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento (60°C para o *A-DntrB* e 57°C para o *A-DntrC*) por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os ciclos de reação, o processo foi encerrado com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos, seguida de resfriamento a 4°C.

A amplificação dos produtos da PCR de colônia foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,0%. As colônias que apresentaram padrão de banda correspondente ao comprimento dos fragmentos *A-DntrB* (1.643 pb) e *A-DntrC* (1.446 pb) após a deleção foram selecionadas e tiveram seus plasmídeos extraídos com uso do “kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), segundo instruções do fabricante. Os plasmídeos, então, foram enviados para serem

sequeenciados com os oligonucleotídeos M13 Forward -40 e M13 Reverse -48 (MESSING, 1983) (Tabela 3).

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento dos fragmentos *A-DntrB* e *A-DntrC* clonados no vetor pNPTS138.

Nome do Oligonucleotídeo*	Sequencia 5'→3'
M13 Forward -40	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13 Reverse -48	AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA

*Oligonucleotídeos obtidos no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Unesp/FCAV.

3.1.5 Transformação em células de *XccA* eletrocompetentes

Os vetores pNPTS138-*A-DntrB* e pNPTS138-*A-DntrC* foram utilizados na transformação em células de *XccA* 306 eletrocompetentes para a deleção dos genes *ntrB* e *ntrC* por recombinação homóloga. O preparo das células foi realizado segundo descrito por Amaral et al. (2004), com algumas modificações. Para tal, uma alçada da linhagem da *XccA* 306 foi plaqueada em meio de cultura sólido NA ("Nutrient Agar": 3 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 g L⁻¹ de peptona e 15 g L⁻¹ de ágar, pH: 6,8 a 7,0) e crescida a 29°C por 72 horas.

Após esse período, preparou-se um pré-inóculo com uma alçada da massa bacteriana que foi adicionada em 5 mL de meio de cultura líquido NB ("Nutrient Broth": 3 g L⁻¹ de extrato de carne e 5 g L⁻¹ de peptona, pH: 6,8 a 7,0), contido em um tubo tipo Falcon de 50 mL. O pré-inóculo foi mantido a 29°C por aproximadamente 12 horas, sob agitação constante de 200 rpm. No final do dia, foram inoculados 2 ml do pré-inóculo em 200 ml de meio líquido NB, contido em um Erlenmeyer de 500 mL. O inóculo foi crescido a 29°C sob agitação contínua de 200 rpm, até atingir uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,5 e 0,8.

Em seguida, os 202 ml resultantes da cultura bacteriana foram transferidos para quatro tubos tipo Falcon estéreis de 50 mL e centrifugados a 4.000 x g por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o "pellet" bacteriano de cada tubo foi ressuscitado suavemente, com a ajuda de um pipetador de 1.000 µL, em 1 mL de água ultrapura autoclavada. O volume de

cada tubo foi completado para 50 ml com água ultrapura autoclavada e centrifugado a $4.000 \times g$ por 15 minutos à temperatura ambiente.

Descartou-se quase todo o sobrenadante e ressuspendeu-se o “pellet” bacteriano de cada tubo no volume de água que restou (aproximadamente 1 mL). Os conteúdos de dois dos tubos foram transferidos individualmente para os outros dois dos quatro tubos iniciais, restando ao final apenas dois tubos. Os volumes dos tubos resultantes foram completados para 50 mL com água ultrapura autoclavada, homogeneizados e centrifugados como descrito anteriormente. O sobrenadante foi novamente descartado, com cuidado, e o “pellet” bacteriano de cada tubo foi ressuspendido no fio de água que sobrou. Finalmente, juntou-se todo o conteúdo em um único tubo e aliquotou-se a suspensão de células da XccA 306 para tubos Eppendorf de 1,5 ml (100 μ L de célula em cada tubo), que foram posteriormente usados no processo de eletroporação.

A eletroporação foi realizada com uma reação padrão e uma reação controle. Para tal, procedendo-se da seguinte maneira: na reação padrão, 100 μ L de células de XccA 306 eletrocompetentes foram eletroporadas no equipamento “Gene Pulser Xcell™System” (Bio-Rad) com 3 μ L (1000 ng) do DNA plasmidial. Por sua vez, no controle, 100 μ L de células da XccA 306 foram eletroporadas com 3 μ L de água ultrapura estéril. As condições utilizadas para a realização da eletroporação foram as seguintes: cubeta com espessura de 0,2 cm, pulso elétrico de 2.500 V e tempo de condução (TC) igual a 2,6 ms.

As células eletroporadas foram recuperadas em 1 mL de meio de cultura líquido NBY (“Nutrient Broth Yeast”: 3 g L⁻¹ de extrato de carne, 5 g L⁻¹ de peptona, 2 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹ de KH₂PO₄) complementado com 0,5 μ L de glicose 20% e 1 μ L de MgSO₄ 1 M. O conteúdo foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL e mantido a 29°C por 4 horas, sob agitação constante de 180 rpm. Depois, 100 μ L da reação padrão foram plaqueados em meio de cultura sólido NA com antibiótico canamicina a 20 μ g mL⁻¹. Como controle negativo, foram plaqueados 100 μ L da reação controle em meio de cultura sólido NA contendo antibiótico canamicina a 20 μ g mL⁻¹ e, como controle positivo, 100 μ L da reação controle foram plaqueados apenas em meio de cultura sólido NA.

As placas foram incubadas a 29°C por 72 horas, até a visualização de colônias isoladas.

3.1.6 Seleção e confirmação dos mutantes

As colônias obtidas após a transformação em células de XccA 306 eletrocompetentes foram usadas na segunda etapa de seleção. Para isso, uma alçada dessas colônias foi inoculada em 5 mL de meio de cultura líquido NB e os inóculos resultantes crescidos a 29°C sob agitação constante de 200 rpm, por aproximadamente 14 horas. As culturas bacterianas foram diluídas nas proporções de 1:10, 1:100 e 1:1000. Posteriormente, 100 µL de cada diluição foram plaqueados em meio de cultura sólido NA suplementado com 3% de sacarose, e as placas foram mantidas a 29°C até a visualização de colônias isoladas.

Para selecionar clones que contenham o gene de interesse, foram feitas reações de PCR das colônias crescidas em meio de cultura sólido NA suplementado com 3% de sacarose. Para isso, procedeu-se como descrito anteriormente no item 3.1.4. Os produtos resultantes das reações de PCR das colônias foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%. E as colônias que apresentaram padrão de banda correspondente ao tamanho dos fragmentos *A-DntrB* (1.643 pb) e *A-DntrC* (1.446 pb) após a deleção foram selecionadas e utilizadas na extração do DNA genômico para confirmar a deleção gênica por meio de PCR e sequenciamento.

As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura líquido NB e mantidas sob agitação de 200 rpm por 16 horas a 29°C. Após esse período, 1 mL dos inóculos foi centrifugado a 16.000 x g por 2 minutos e as células precipitadas usadas na extração do DNA genômico utilizando o “kit Wizard® Genomic DNA Purification” (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os DNAs obtidos foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Scientific”), diluídos e usados nas reações de PCR com a “GoTaq® DNA Polymerase” (“Thermo Scientific”) e os oligonucleotídeos A e D, como descrito anteriormente, com 50 ng de DNA genômico. Apenas os produtos das reações de PCR que apresentaram fragmento de DNA com banda correspondente ao tamanho esperado foram selecionados, purificados, diluídos para a concentração de 50 ng e, então, sequenciados.

A reação de sequenciamento foi composta por 50 ng do produto de PCR purificado, 3,0 µL de tampão de sequenciamento, 1,0 µL de “BigDye” v3.1 (“Applied Biosystems”), 10 pmoles dos oligonucleotídeos (A e D, separadamente) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 10 µL. O sequenciamento de cada fragmento de DNA (A-*DntrB* e A-*DntrC*) consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 39 ciclos de amplificação a 96°C por 15 segundos, 52°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

A seguir, adicionaram-se 80 µL de isopropanol 75% em cada tubo de reação e incubaram-se os tubos por 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 3.040 x g por 30 minutos em centrífuga 5810R com rotor para placas “Swing-bucket rotor” A-4-62-MTP (Eppendorf). Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e as amostras foram lavadas duas vezes com 200 µL de etanol 70% e novamente centrifugadas por 10 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas a vácuo. Depois, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida, desnaturadas por 5 minutos a 95°C em termociclador e submetidas ao sequenciamento no ABI 3730xl “DNA analyzer” (“Applied Biosystems”), conforme recomendações sugeridas pelo fabricante.

3.1.7 Confirmação da identidade da XccA mutada

Para avaliar se os mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* eram procedentes da linhagem XccA 306 e não de um contaminante, foram efetuadas reações de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores Xac01 (5'-CGC CAT CCC CAC CAC CAC CAC GAC-3') e Xac02 (5'-AAC CGC TCA ATG CCA TCC ACT TCA-3'), específicos para a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (COLETTA-FILHO et al., 2006). As reações de PCR foram compostas por 50 ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada dNTP, 1,0 U de “GoTaq® DNA Polymerase” (“Thermo Scientific”), 1X do tampão da enzima, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Xac01 e Xac02), 1,5 mM de MgCl₂ e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 20 µL.

O material resultante foi amplificado em termociclador “Veriti® 96-Well Thermal Cycler” (“AB Applied Biosystems”), com as amostras sendo inicialmente submetidos à desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida por 25 ciclos de amplificação. A cada ciclo, as amostras sofreram em cadeia as etapas de

desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os ciclos de reação, o processo foi encerrado com uma extensão final a 72°C por 10 minutos, seguida de resfriamento a 4°C. A reação de confirmação foi realizada com três controles negativos e um positivo: o DNA da bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, estirpe B (XauB) e estirpe C (XauC), água ultrapura estéril e o DNA da bactéria XccA 306, respectivamente.

3.2 Teste de patogenicidade *in planta*

Para o ensaio de patogenicidade, amostras da bactéria XccA 306 e dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ foram plaqueadas separadamente em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NA e mantidas a 29°C por 72 horas. Após esse período, uma massa de células bacterianas foi transferida para 10 mL de meio de cultura líquido NB e incubada a 29°C sob agitação constante de 180 rpm até atingir uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,3 e 0,8, correspondente a fase log de crescimento bacteriano.

As suspensões bacterianas de XccA 306 e dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ foram centrifugadas a 4.000 x g por 15 minutos à 4°C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se água ultrapura estéril aos “pellets bacterianos resultantes, a fim de ajustar a densidade óptica (DO_{600nm}) para 0,3 e a concentração dos inóculos foi normalizada para 10^6 UFC/mL por meio de diluições seriadas. Três plantas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), oriundas do Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, SP, BR), foram utilizadas para testar cada mutante. De cada planta, nove folhas jovens completamente expandidas foram inoculadas pelo método de infiltração por pressão, com auxílio de uma seringa hipodérmica sem agulha, em dois pontos na parte abaxial das folhas; e outras nove folhas, inoculadas por perfuração do limbo foliar com agulha de 0,45 mm de diâmetro em oito pontos da folha. À esquerda da nervura central, foi inoculada a linhagem selvagem XccA 306, enquanto à direita, inoculado o mutante $\Delta ntrB$ ou o $\Delta ntrC$. Como controle negativo, uma folha de cada planta foi inoculada apenas com água ultrapura estéril.

As plantas inoculadas foram mantidas em laboratório de segurança localizado nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) da

Unesp/FCAV, sob condições controladas de temperatura (29°C), fotoperíodo 12h/12h (12 horas de luz seguido de 12 horas de escuro) e umidade (em torno de 80%). Para a avaliação dos sintomas da doença, as folhas foram fotografadas aos 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27 e 30 dias após a inoculação (DAI).

3.3 Crescimento bacteriano *in vitro*

A preparação dos inóculos foi realizada pelo cultivo da bactéria XccA 306 e dos mutante $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ separadamente em meio de cultura sólido NA a 29°C por 72 horas. Após esse período, uma massa de células bacterianas foi diluída em 20 mL de meio de cultura líquido NB e incubada por 12 horas a 29°C sob agitação contínua de 200 rpm. As suspensões bacterianas foram ajustadas para densidade óptica (DO_{600nm}) igual a 0,1 utilizando o espectrofotômetro DU-730 (“Beckman Coulter”). Alíquotas de 1,5 mL das suspensões foram transferidas em triplicata em cada poço da placa “multiwell” de 24 poços, a qual foi mantida a 29°C sob agitação constante em leitor de microplacas “Biotek Synergy H1” (“BioTek”). A densidade óptica (DO_{600nm}) dos poços foi registrada a cada 30 minutos por um período de 24 horas para a placa do mutante $\Delta ntrB$ e de 30 horas para a placa do $\Delta ntrC$. Após a leitura, os dados gerados pelo leitor de microplacas foram utilizados para elaborar as curvas de crescimento com o programa “Graphpad Prism6”.

3.4 Crescimento bacteriano *in planta*

Suspensões bacterianas da XccA 306 e dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ na concentração de 10^6 UFC/mL foram infiltradas por pressão em quatro pontos por folha. Cada isolado foi inoculado em 15 folhas por planta; e, para cada mutante, utilizadas três plantas de limão-cravo. Para a quantificação do crescimento bacteriano, foram coletados do ponto de inoculação quatro discos foliares com 1 cm^2 aos 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 25 dias após a inoculação (DAI). O tecido vegetal foi macerado em 1 mL de tampão PBS 1 X (8 g L^{-1} de NaCl, $0,20\text{ g L}^{-1}$ de KCl, $1,44\text{ g L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 , $0,24\text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , pH 7,30); e, quando necessário, foram feitas diluições seriadas. Alíquotas de 50 μL foram plaqueadas em meio sólido NA e as colônias bacterianas foram contadas depois de 48 horas de incubação a 29°C.

3.5 Crescimento bacteriano em meios mínimos com e sem albumina sérica bovina (BSA)

Para a avaliação da capacidade de crescimento em meios mínimos de composição conhecida com e sem albumina sérica bovina (BSA), suspensões bacterianas de XccA 306 e dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* foram ajustados para densidade óptica (DO_{600nm}) igual a 0,5. Então, 1 mL desses cultivos foi inoculado em 10 mL dos meios XAM1 (7,4 mM $(NH_4)_2SO_4$, 32 mM KH_2PO_4 , 64 mM, K_2HPO_4 , 1,6 mM citrato de sódio, 10 mM frutose, 10 mM sucralose, 0,03% casaminoácidos e 1 mg mL⁻¹ BSA, pH 5,4), XAM1 sem 1 mg mL⁻¹ de BSA, 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 $FeSO_4$, 10 mM frutose, 10 mM sucralose e 0,03% casaminoácidos, pH 6,7) e XVM2 com 1 mg mL⁻¹ de BSA. Durante todo o experimento, os inóculos foram mantidos a 29°C sob agitação contínua de 180 rpm. O crescimento bacteriano foi monitorando por meio da medição da densidade ótica (DO_{600nm}) nos tempos 0, 1, 3, 6, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33 e 37 horas após a inoculação. Para isso, a cada tempo de coleta, 200 µL de cada inóculo foram retirados e a densidade ótica (DO_{600nm}) lida em Espectrofotômetro 6131 (Eppendorf).

3.6 Formação de biofilme *in vitro*

Os ensaios de biofilme foram realizados como descrito por Yan, Hu e Wang (2012), com modificações. Células bacterianas da XccA 306 e dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* inicialmente crescidas em meio sólido NA foram inoculadas separadamente em 10 mL de meio líquido NB e, incubadas a 29°C por 12 horas. A densidade ótica (DO_{600nm}) foi ajustada para 0,3 (10^8 UFC/mL) e, então, 1 mL dessas suspensões foi transferido para tubos de ensaio de borosilicato estéreis de 20 mL e mantidos sem agitação em câmara umidificada por 72 h a 29°C. As culturas foram descartadas e os tubos lavados duas vezes com 1 mL de água da torneira. O biofilme formado nos tubos foi visualizado por coloração com violeta genciana a 0,1% por 30 minutos, e as células fixadas com o corante foram dissolvidas em 1 mL de solução de etanol-acetona na razão de 80:20 (v/v) e quantificadas pela medição da densidade ótica em 595 nm com a utilização do leitor de microplacas “iMark”™ (“Bio-Rad Laboratories”,

Inc., EUA). As medições quantitativas representaram as médias obtidas de quatro repetições técnicas provenientes de quatro colônias (repetições biológicas).

3.7 Extração e quantificação de goma xantana

A goma xantana da XccA 306 e dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* foi extraída de acordo com Lo et al. (1997), com modificações. Para tal, três colônias isoladas (réplica biológica) de cada bactéria (XccA 306 e mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC*) foram transferidas separadamente para 10 mL de meio NB contidos em tubos tipo Falcon de 50 mL. Os inóculos foram incubados a 29°C sob agitação constante de 180 rpm até atingir densidade óptica (DO_{600nm}) igual a 0,3. A seguir, foram transferidos 2,5 mL de cada inóculo para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio goma xantana (25 g L⁻¹ de glicose, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,1 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O, pH 7,0), e mantidos durante 96 horas a 29°C sob agitação constante de 180 rpm. Após esse período, 100 mL de cultura foram centrifugados em tubos de centrífuga a 10.000 x g a 4°C por 40 minutos. Os “pellets” bacterianos foram ressuspensos em 1 mL de H₂O bidestilada autoclavada e transferidos para Beckers de vidro (com peso conhecido), sendo mantidos a 70°C por 24 horas. Por fim, os Beckers contendo os “pellets” foram pesados.

Os sobrenadantes foram, então, transferidos para Beckers de plástico de 500 mL, nos quais foram dissolvidos 4 g de KCl por agitação durante 15 minutos e adicionados 200 mL de isopropanol gelado para a precipitação da goma. A goma formada foi transferida para copos plásticos descartáveis de 50 mL (com pesos conhecidos), os quais foram mantidos a 37°C por 72 horas e pesados novamente. A razão entre o peso da goma e o peso da massa de bactérias correspondente fornece a quantidade de goma produzida pela biomassa de bactéria presente no meio de cultura.

3.8 Avaliação da motilidade bacteriana

Para verificar se as mutações dos genes *ntrB* e *ntrC* têm algum efeito na motilidade bacteriana, os mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* foram testados quanto à motilidade tipo “swimming” e tipo “swarming”. Os testes de motilidade “swimming” e

“swarming” foram realizados em meio ágar (10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de NaCl) contendo respectivamente 0,3% (p/v) e 0,7% (p/v) de ágar, conforme descrito por Li e Wang (2011b), com modificações. As bactérias (XccA 306 e mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC*) foram crescidas em meio líquido NB por 14 horas; e 2 µl de cada cultura, com densidade ótica (DO_{600nm}) normalizada para 0,3, foram usados para inoculação, por meio de gotas, em placas com meio ágar contendo 0,3% (p/v) e 0,7% (p/v) de ágar. Os ensaios foram realizados com três réplicas biológicas e três réplicas técnicas para a XccA 306 e os mutantes. O crescimento foi analisado após 72 horas de incubação a 29°C e o diâmetro das colônias foi medido com a utilização do programa ImageJ 1.46f (FERREIRA; RASBAND, 2012).

3.9 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Visando avaliar a possível relação entre a perda de virulência dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* e a expressão dos genes do sistema de secreção tipo 3 (SST3), bem como verificar se as mutações dos genes *ntrB* e *ntrC* poderiam afetar o início da cascata reguladora do SST3, analisou-se a expressão dos genes reguladores *hrpG* e *hrpX*, do gene *hrpW* e de alguns genes do “cluster” *hrp* (*hpa1*, *hrpE* e *hrpD6*) na bactéria XccA 306 selvagem e nos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* cultivados nos meios líquidos NB (controle) e XVM2 (indutor de genes de patogenicidade, tratamento), empregando-se a técnica de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

3.9.1 Obtenção de RNA total bacteriano em meios NB e XVM2

Para obtenção do material bacteriano, amostras da bactéria XccA 306 e dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* foram cultivadas separadamente em placas de Petri contendo meio de cultura sólido NA e mantidas a 29°C por 72 horas. De cada linhagem bacteriana, três colônias isoladas (réplicas biológicas) foram transferidas separadamente para 10 mL tanto do meio NB (controle) como do meio XVM2 (tratamento). As suspensões bacterianas foram mantidas a 29°C sob agitação constante de 180 rpm até atingir uma densidade ótica (DO_{600nm}) igual a 0,3 (16 horas para o meio NB e 24 horas para o XVM2). De cada suspensão, 1,5 mL foi coletado e centrifugado a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C, obtendo-se uma massa de

células sedimentada, da qual foi extraído o RNA total com a utilização do “kit RNeasy Protect Bacteria Mini” (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração das amostras de RNAs foi avaliada por espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (“Thermo Fisher Scientific”), e as amostras que apresentaram relações de absorbância 260/280 e 260/230 dentro dos valores indicados como ideais foram submetidas à análise de pureza mediante leitura em fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) e com uso dos “kits Qubit® RNA BR Assay” e “Qubit® DNA HS Assay” (Invitrogen). A leitura com o “kit Qubit® DNA HS Assay” é para assegurar que não haja contaminação das amostras de RNA total com DNA e que este não interfira nas reações de qRT-PCR. A integridade do RNA total foi verificada pelo equipamento “Agilent 2100 Bioanalyzer” (“Agilent Technologies”). Valores de RIN (“RNA Integrity Number”) iguais ou superiores a 7,0 são considerados satisfatórios. Somente RNAs com alto grau de pureza e com qualidade foram utilizados para a síntese da primeira fita de cDNA.

3.9.2 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total com a utilização do “kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR” (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Após a síntese, o cDNA foi quantificado em espectrofotômetro “NanoDrop® ND-1000” (“Thermo Scientific”) e estocado a -80°C para subsequente utilização.

3.9.3 Oligonucleotídeos utilizados na qRT-PCR

Na Tabela 4, estão descritas as características gerais dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo, cujas sequências foram obtidas a partir de pesquisas realizadas por Jacob et al. (2011) e Jacob et al. (2014). Para a análise da expressão gênica diferencial dos genes do SST3 da XccA 306 e dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC*, foram empregados três genes endógenos (*atpD*, *rpoB* e *gyrB*), cuja estabilidade de expressão foi avaliada com o programa “Expression Suite Software v1.0.3” (“Applied Biosystems”).

Tabela 4. Características gerais dos oligonucleotídeos utilizados na PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Locus_tag Antigo**	Locus_tag novo***	Gene	Gene ID	Produto (Anotação NCBI)	Primers 5'→3'	Amplicon (bp)	Eficiência de amplificação
XAC3649	XAC_RS18450	<i>atpD</i>	1157720	Subunidade β da ATP sintase	F: CGGCGCACCGTCGTAT R: CCGGTTTCCAGCAATTCG	53	107,5
XAC0965	XAC_RS04940	<i>rpoB</i>	1155036	Subunidade β da RNA polimerase	F: GGATTCCTATCGCGAATTCCT R: TGTAGCTGGAATCGGGAACA	103	103,1
XAC0004	XAC_RS00025	<i>gyrB</i>	1154075	Subunidade B da DNA Girasse	F: CGTCCCGGCATGTATATCG R: ACCACCTCGAACACCATGTGA	67	90,1
XAC0398	XAC_RS02090	<i>hrpD6</i>	1154469	Proteína HrpD6	F: ACCGATACGGTCACCCAAGA R: GATCCGCCGCCTTGGT	55	106,0
XAC1265	XAC_RS06455	<i>hrpG</i>	1155336	Proteína HrpG	F: CGGCAAGCCGATCGTATT R: GAAAAGAGCAGCCAGGCAAT	54	108,3
XAC0397	XAC_RS02085	<i>hrpE</i>	1154468	Proteína HrpE	F: ACGAGGCCCGAGAAGTCCAT R: CCACGTTGAAGTCCAGATCATTT	66	101,0
XAC0416	XAC_RS02180	<i>hpa1</i>	1154487	Proteína Hpa1	F: GCAGCAGGCCGGTCAGT R: TTCATCAGCATCTGGGTGTATTG	57	90,5
XAC1266	XAC_RS06460	<i>hrpXct</i>	1155337	Proteína HrpX	F: GCCTACAGCTACATGATCACCAAT R: TGC GGCCACTTCGTTGA	63	91,2
XAC2922	XAC_RS14835	<i>hrpW</i>	1156993	Proteína HrpW	F: GGCGGACACACCGACATC R: TGCCTTTCAGGGTGGAGTCTT	58	97,6

*F: sequência do oligonucleotídeo direto ("Forward"); R: sequência do oligonucleotídeo reverso ("Reverse").

**Locus_tag antigo: antigos identificadores aplicados a cada gene em um genoma.

***Locus_tag novo: novos identificadores aplicados a cada gene em um genoma.

3.9.4 Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

Para determinar as concentrações ideais dos oligonucleotídeos iniciadores a serem empregadas nas reações de qRT-PCR, efetuou-se a titulação desses. Para tanto, foram testadas concentrações próximas às sugeridas em “Real-time PCR Handbook” (LIFETIME..., 2017). Para cada par de oligonucleotídeos (direto e reverso), foram testadas nove concentrações (Tabela 5), resultantes da combinação de três concentrações de oligonucleotídeos diretos com três de reversos (100 η M, 300 η M e 600 η M).

Tabela 5. Concentrações de oligonucleotídeos iniciadores diretos e reversos empregadas nas titulações.

Concentrações		Oligonucleotídeo direto (η M)		
		100	300	600
Oligonucleotídeo reverso (η M)	100	100/100	100/300	100/600
	300	300/100	300/300	300/600
	600	600/100	600/300	600/600

As reações de titulação foram montadas em placas “multiwell” de 96 poços e compostas por 6,25 μ L de Power SYBR® Green Master Mix” (“Applied Biosystems”), 1,25 μ L de iniciador direto, 1,25 μ L de iniciador reverso, 2 μ L do “pool” de todas as amostras de cDNA (100 η g) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de 12,5 μ L. Como controle negativo, realizou-se reação semelhante, porém substituindo o cDNA por água ultrapura estéril. Todas as reação foram realizadas no termociclador “7500 Real-time PCR System” (“Applied Biosystems”), no qual as amostras foram submetidas a um ciclo de amplificação inicial de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os resultados gerados foram analisados com o programa “7500 software v 2.0.6” (“Applied Biosystems”).

3.9.5 Curva padrão para determinação da concentração de cDNA ideal

Após a determinação da concentração de oligonucleotídeos iniciadores mais apropriado para o experimento, construiu-se uma curva padrão para cada gene alvo

e endógeno para verificar a eficiência de amplificação das reações e indicar a melhor concentração de cDNA a ser empregada nas reações de quantificação da expressão gênica subsequentes.

As reações de amplificação da curva padrão foram realizadas como descrito anteriormente no item 3.9.4, porém com as concentrações de oligonucleotídeos diretos e reversos ideais determinadas na etapa de titulação (300/300). Para a composição dos pontos na curva padrão, foi constituído um “pool” de toda as amostras de cDNA e, em seguida, foram usadas sete concentrações desse “pool” de cDNA diluídas em série na proporção de 1:2 (80 ng, 40 ng, 20 ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng e 1,25 ng). Os resultados de todas as curvas padrão foram analisados com o programa “7500 Real-time PCR System” (“Applied Biosystems”). A eficiência de amplificação da reação de qRT-PCR foi calculada para cada um dos genes (Tabela 4). As reações cujas retas apresentaram valores de coeficiente de correlação (R^2) igual ou maior do que 0,99 e inclinação entre -3,58 e -3,10, que corresponde respectivamente à eficiência de reação (EFF%) entre 90% e 110%, foram consideradas adequadas (LIFETIME..., 2017). A concentração de cDNA selecionada para ser utilizada nos ensaios de quantificação da expressão relativa dos genes foi de 40 ng.

3.9.6 Quantificação relativa da expressão dos genes

A quantificação da expressão relativa dos genes da XccA 306 e dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* foi realizada empregando-se o método do CT Comparativo ($\Delta\Delta CT$). O principal fundamento desse método é o chamado “threshold cycle” (CT) ou limiar do ciclo, que representa o ciclo de PCR em que o sinal fluorescente do corante sinalizador da reação cruza uma linha arbitrária denominada “threshold” ou limiar. O valor numérico do CT é inversamente proporcional à quantidade de “amplicon” da reação, isto é, quanto menor for o CT, maior será a quantidade de “amplicon” e, consequentemente, maior a expressão do gene em questão (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Nas reações de quantificação relativa, foi utilizada uma placa de 96 poços para cada um dos nove genes (três genes endógenos e seis genes alvos), contendo todas as amostras bacterianas (XccA 306 selvagem e mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC*)

cultivadas em meios NB e XVM2, com três réplicas biológicas e três técnicas, além do controle negativo (água ultrapura estéril). As reações de quantificação consistiram em Power SYBR® Green Master Mix 1X, 40 ng de cDNA e 300 nM para todos os iniciadores diretos e reversos, sendo realizadas nas mesmas condições de amplificação descritas no item 3.9.4. Por fim, para verificar a especificidade das reações de qRT-PCR, realizou-se a curva de dissociação para cada reação. Os resultados gerados foram analisados com o programa “7500 Real-time PCR System” (“Applied Biosystems”).

3.10 Análises estatísticas dos dados

Os dados de formação de biofilme, de produção de goma xantana, de motilidade bacteriana e de expressão relativa dos genes foram submetidos a análises estatísticas, em delineamento inteiramente casualizado, empregando-se o programa ASSISTAT, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.11 Modelagem molecular das proteínas NtrC e HrpG

O servidor “online” I-TASSER (“Iterative Threading Assembly Refinement”) (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) foi empregado para gerar as estruturas tridimensionais das proteínas NtrC e HrpG. O I-TASSER é uma plataforma integrada para a predição automatizada de estrutura e função da proteína com base no paradigma de sequência-estrutura-função (ROY; KUCUKURAL; ZHANG, 2010). Partindo de uma sequência de aminoácidos (aa), o I-TASSER primeiro gera modelos atômicos tridimensionais (3D) a partir de alinhamentos de fragmentos múltiplos e simulações de montagem estrutural iterativa. Foi realizada a modelagem das regiões receptoras das proteínas NtrC (10-122 aa) e HrpG (8-122 aa), por ser nessas regiões que são estabelecidas as interações proteína-proteína com a região citoplasmática da proteína histidina quinase, durante o processo de fosforilação no TCS. As estruturas tridimensionais do PDB (Protein Data Bank) utilizadas como molde para modelar NtrC e HrpG foram respectivamente 5EP0 e 4QPJ. Estas proteínas foram selecionadas de acordo com o ranking estabelecido

pelo I-TASSER. A qualidade estéreo-química dos modelos gerados foi avaliada pela análise dos gráficos de Ramachadran com a utilização do servidor RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>). Os modelos tridimensionais gerados para as proteínas NtrC e HrpG foram utilizados para a realização do alinhamento tridimensional entre as regiões receptoras dessas proteínas. A visualização gráfica de todas as estruturas tridimensionais preditas foi realizada por meio do programa PyMOL (“PyMOL Molecular Graphics System”, versão 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

4 RESULTADOS

4.1 Mutação sítio-dirigida por PCR para obtenção dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$

Por meio da técnica de mutação sítio-dirigida por PCR, foram obtidos mutantes dos genes *ntrB* (XAC_RS01085) e *ntrC* (XAC_RS01090) da XccA 306. Esses genes codificam, respectivamente, as proteínas histidina quinase (NtrB) e regulador de resposta (NtrC), pertencentes a um sistema de dois componentes, que atuam no sistema regulador de nitrogênio (NTR). Na Figura 10, observam-se os fragmentos de DNA obtidos dos produtos resultantes das reações de PCR primárias (AB e CD) e PCR de ligação (AD) para a obtenção dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$.

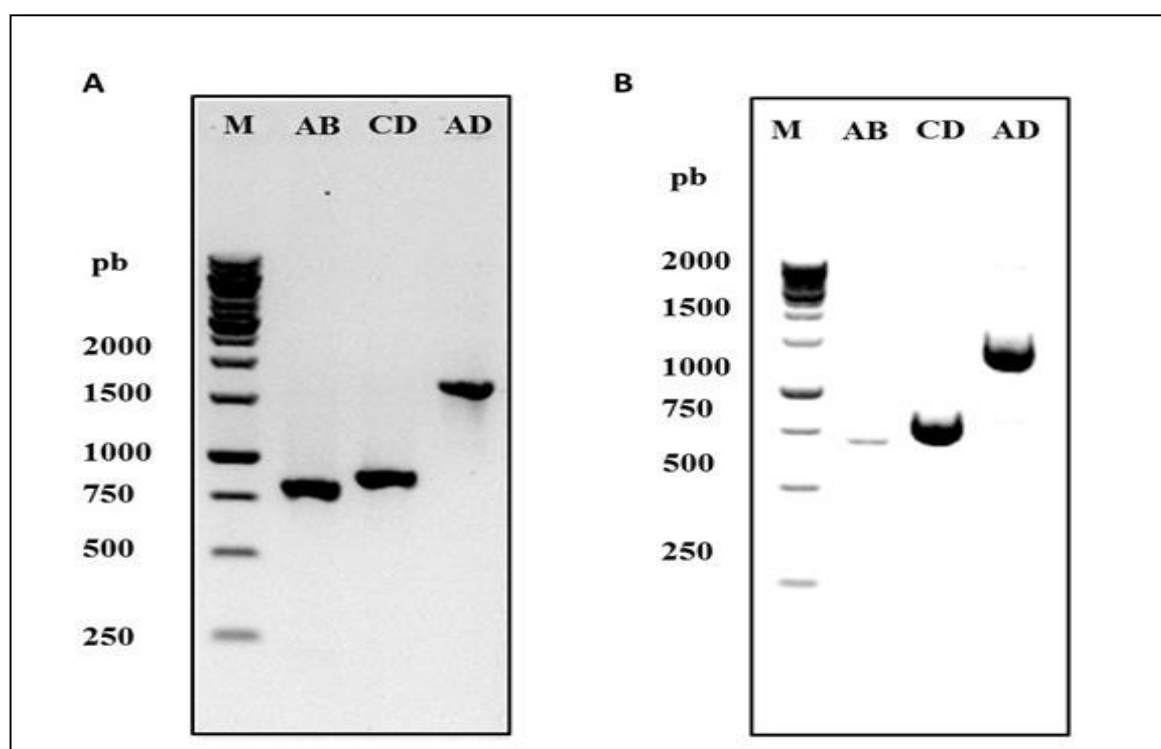


Figura 10. Géis de eletroforese em agarose (1%) dos produtos resultantes das reações de PCR primárias (AB e CD) e PCR de ligação (AD) para obtenção dos mutantes $\Delta ntrB$ (A) e $\Delta ntrC$ (B). M: marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas). AB: Fragmento AB (788 pb), CD: Fragmento CD (855 pb) e AD: Fragmento AD (1.643 pb) (A). AB: Fragmento AB (677 pb), CD: Fragmento CD (787 pb) e AD: Fragmento AD (1.446 pb) (B).

Todos os fragmentos apresentaram os tamanhos previstos de 788 pb e 677 pb (PCR A-B), 855 pb e 787 pb (PCR C-D) e 1.643 pb e 1.446 pb (PCR A-D), respectivamente para os mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC*.

Os produtos resultantes das reações de PCR com os DNAs genômicos da XccA 306 (controle positivo) e das colônias provenientes dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC*, com os oligonucleotídeos A e D, estão ilustrados nas Figuras 11A e 11B. Já os produtos das reações de PCR com os oligonucleotídeo Xac01 e Xac02, específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, e os DNAs de XauB e XauC (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*), controles negativos, são observados na Figura 11C. A amplificação das colônias mutadas com os oligonucleotídeos A e D, após a deleção dos genes, produziu fragmentos com tamanho esperado de 1.643 pb para o mutante *ΔntrB* (Figura 11A); porém, apenas as colônias 5, 6 e 7 do mutante *ΔntrC* geraram fragmentos com 1.446 pb (Figura 11B).

Os produtos da amplificação da XccA 306 apresentaram fragmentos de 2.686 pb (Figura 11A) e de 2.884 pb (Figura 11B), correspondentes à região sem a deleção dos genes. Por sua vez, as colônias provenientes dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC*, quando testadas com os oligonucleotídeos Xac01 e Xac02, geraram fragmentos com o tamanho previsto e igual ao do fragmento da XccA 306 (581 pb), enquanto nenhum produto de amplificação foi obtido para XauB e XauC (Figura 11C).

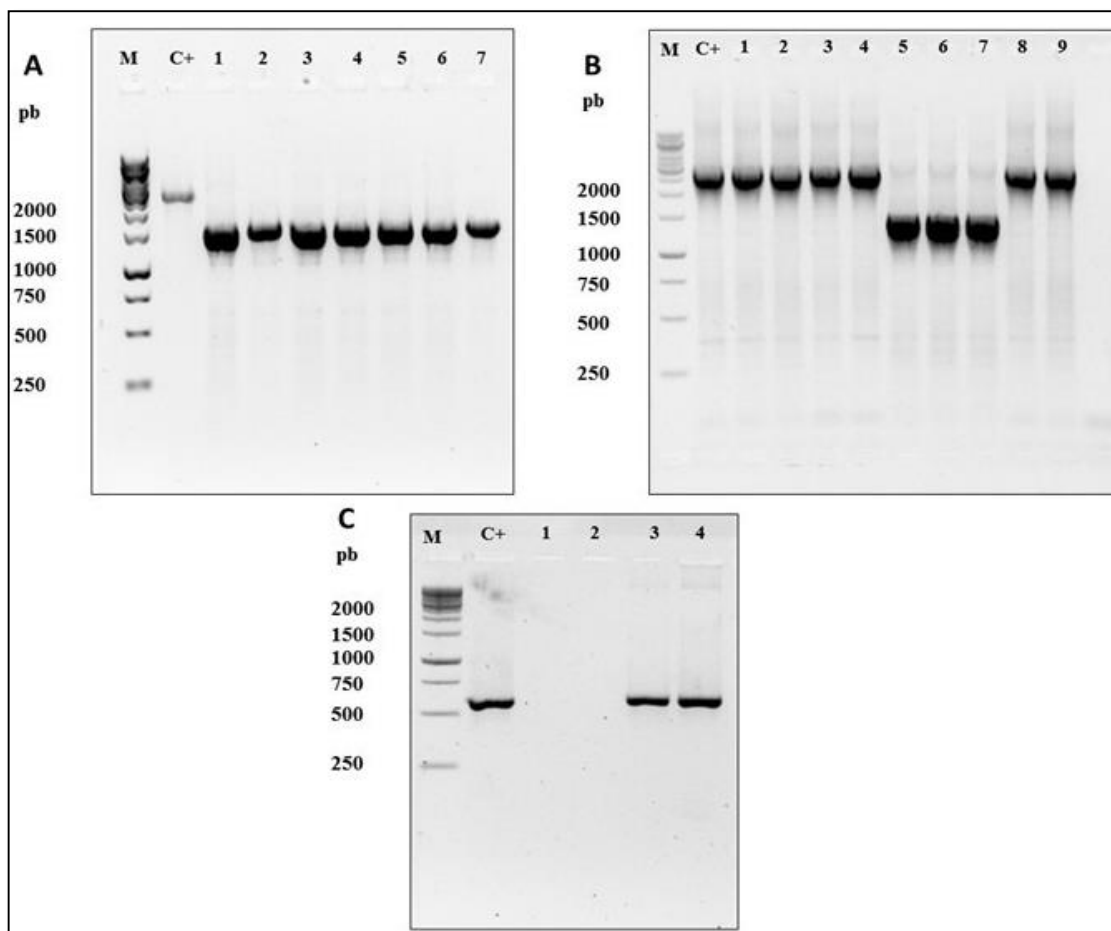


Figura 11. Geís de eletroforese em agarose (1%) dos produtos resultantes das reações de PCR com os oligonucleotídeos A e D e os DNAs genômicos da XccA 306 (controle positivo) e das colônias provenientes dos mutantes $\Delta ntrB$ (A) e $\Delta ntrC$ (B), e com os oligonucleotídeos Xac01 e Xac02 (específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*) e os DNAs de XauB e XauC (*Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, controles negativos (C). M: Marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas); C+: XccA 306; 1 a 7: colônias de $\Delta ntrB$ mutadas (A). M: Marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas); C+: XccA 306; 1, 2, 3, 4, 8 e 9: colônias de $\Delta ntrC$ não mutadas; 5, 6 e 7: colônias mutadas (B). C+: XccA 306; 1: XauB; 2: XauC; 3: Mutante $\Delta ntrB$; 4: Mutante $\Delta ntrC$ (C).

4.2 Teste de patogenicidade e curvas de crescimento *in planta* e *in vitro*

Conforme o teste de patogenicidade, os mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$, quando inoculados em plantas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), apresentaram redução da capacidade de produzir sintomas do cancro cítrico em comparação à cepa selvagem XccA 306 (Figuras 12 e 14). As diferenças foram mais notáveis no

30º dia após a inoculação (DAI), quando a XccA 306 apresentou maior capacidade de causar encharcamento, hiperplasia e necrose do tecido vegetal, além de maior expansão a partir do ponto de inoculação. Esses resultados foram corroborados pela análise das curvas de crescimento *in planta* (Figuras 13A e 15A), que revelaram que a deleção dos genes *ntrB* e *ntrC* reduziu a multiplicação da população de bactérias em folhas de limão-cravo a partir do 3º DAI em diante. Tais resultados indicam que a deleção dos genes *ntrB* e *ntrC* afetou de forma indireta a virulência da XccA 306 durante o processo de desenvolvimento do cancro cítrico.



Figura 12. Teste de patogenicidade da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrB$, inoculados em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) na concentração de 10^6 UFC/ml, com sintomas avaliados aos 7, 15 e 30 dias após a inoculação (DAI). Parte superior da figura, inoculação pelo método de infiltração por pressão e parte inferior da figura, inoculação pelo método de perfuração do limbo foliar.

Por sua vez, a velocidade e o padrão de crescimento do mutante $\Delta ntrB$ foram semelhantes ao da XccA 306 em meio de cultura líquido NB, ou seja, com crescimento lento nas primeiras 4 a 5 horas (fase lag), seguido de crescimento exponencial (fase log) e estabilização da curva após cerca de 12 horas (fase estacionária) (Figura 13B). Entretanto, embora tenha apresentado curva de crescimento similar ao da XccA 306, o mutante $\Delta ntrC$ teve um crescimento relativamente reduzido (densidade óptica [DO_{600nm}]) em comparação ao da XccA 306, principalmente a partir das 10^a hora, voltando a apresentar densidade óptica (DO_{600nm}) semelhante à da XccA 306 no tempo de 27 a 28 horas (Figura 15B).

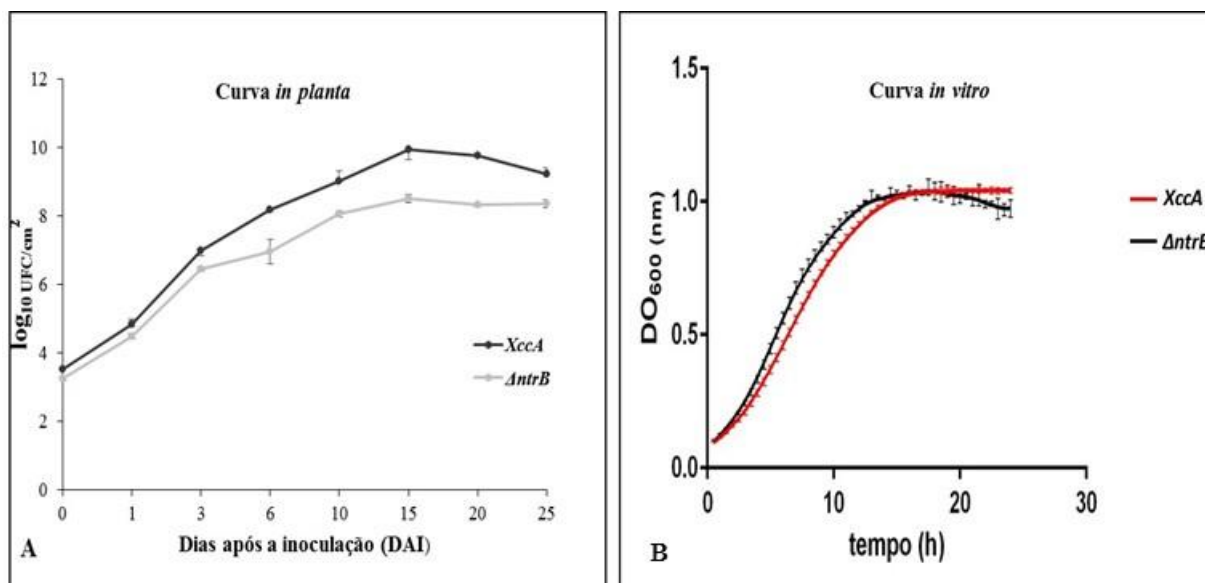


Figura 13. Curva de crescimento *in planta* da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrB$, em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), a 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 25 DAI, gerada com base na contagem de colônias (A). Curva de crescimento *in vitro* da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrB$ em meio líquido NB, elaborada a partir dos valores da leitura da densidade óptica (DO_{600nm}) por um período de 24 horas (B).



Figura 14. Teste de patogenicidade da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrC$, inoculados em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck) na concentração de 10^6 UFC/ml, com sintomas avaliados aos 7, 15 e 30 dias após a inoculação (DAI). Parte superior da figura, inoculação pelo método de infiltração por pressão e parte inferior da figura, inoculação pelo método de perfuração do limbo foliar.

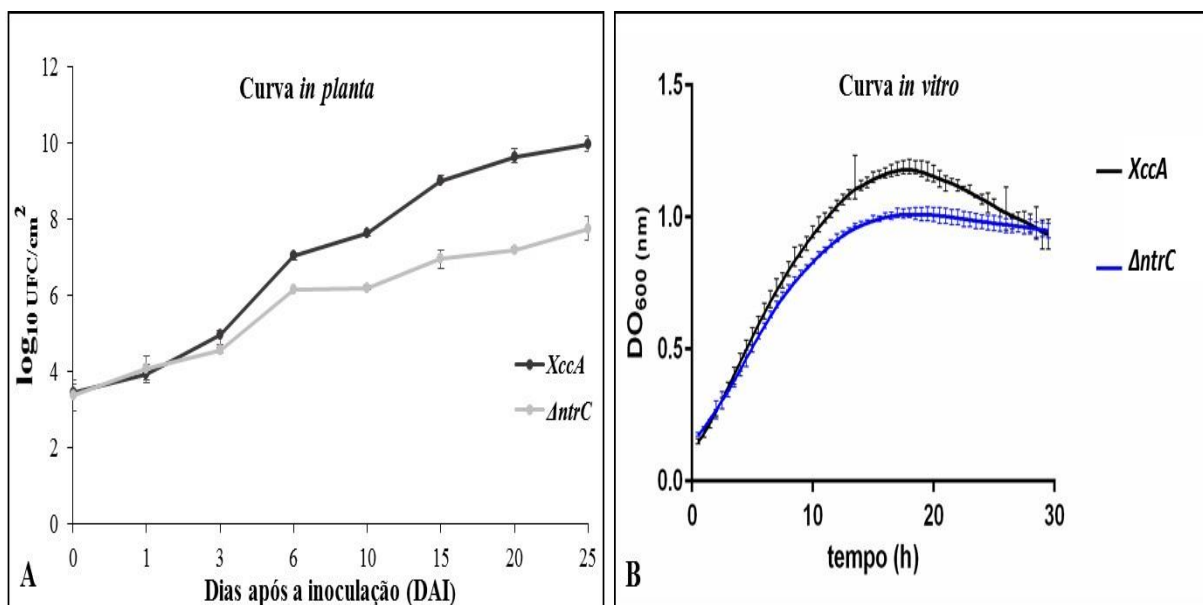


Figura 15. Curva de crescimento *in planta* da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrC$, em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), a 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 e 25 DAI, gerada com base na contagem de colônias (A). Curva de crescimento *in vitro* da XccA 306 e do mutante $\Delta ntrC$ em meio líquido NB, elaborada a partir dos valores da leitura da densidade óptica (DO_{600nm}) por um período de 30 horas (B).

Os resultados das curvas de crescimento *in vitro* demonstraram que a ausência do gene *ntrB* não alterou a viabilidade da bactéria. No entanto, a mutação do gene *ntrC* afetou o “fitness” bacteriano da XccA 306 em meio de cultura líquido NB.

4.3 Crescimento bacteriano em meios mínimos com e sem albumina sérica bovina (BSA)

Verifica-se que tanto a XccA 306 quanto o mutante $\Delta ntrB$ cresceram melhor em meios contendo albumina sérica bovina (BSA) como fonte de nitrogênio (Figuras 16A e D); além disso, foi possível notar diferença de comportamento entre o crescimento bacteriano “*in vitro*” da XccA 306 e o dos mutantes em resposta à disponibilidade de nitrogênio nos meios de cultura (Figuras 16A, B, C e D).

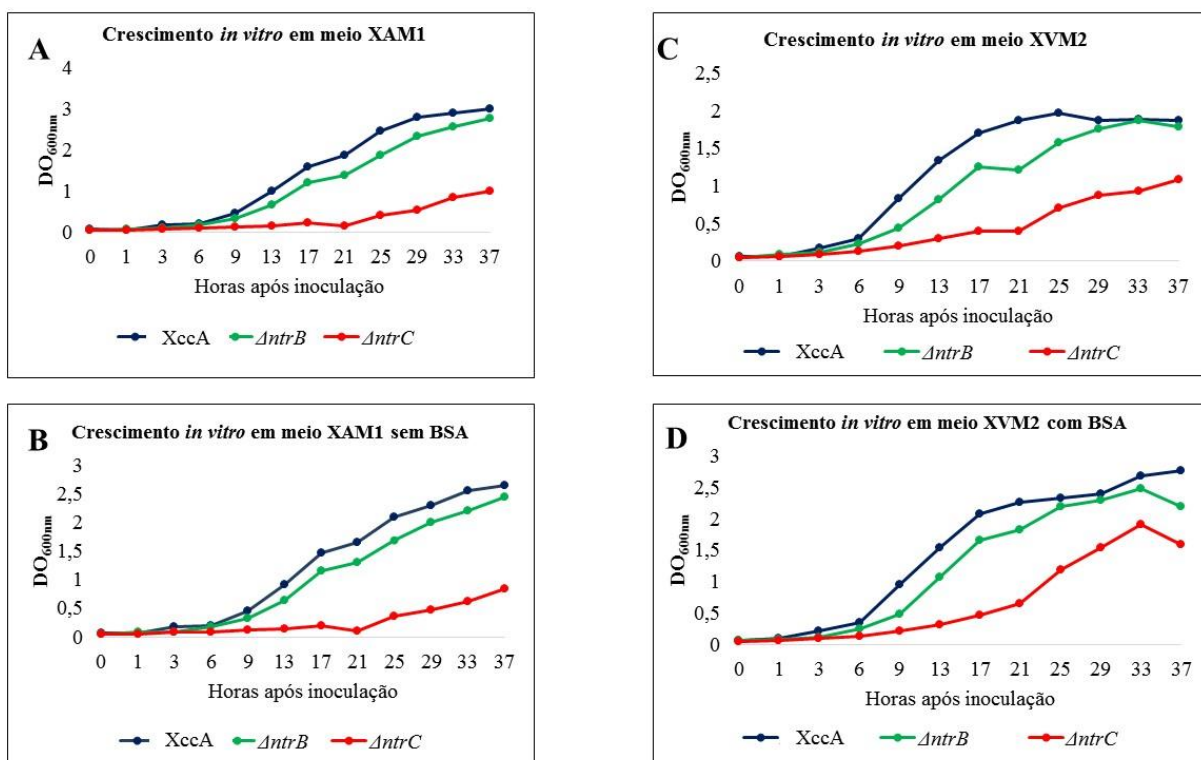


Figura 16. Crescimento bacteriano *in vitro* da XccA 306 e dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ nos meios mínimos, com e sem albumina sérica bovina (BSA), XAM1 (A), XAM1 - BSA (B), XVM2 (C) e XVM2 + BSA (D). Para a elaboração das curvas, foram utilizados os dados de medição da DO_{600nm} no período de 37 horas.

Embora o mutante $\Delta ntrB$ tenha apresentado tendência de crescimento semelhante ao da XccA, o crescimento dele foi, de um modo geral, sempre inferior ao desta em todas as condições de cultivo, alcançando maior crescimento no meio XAM1 (Figura 16A). Por sua vez, o mutante $\Delta ntrC$ não conseguiu crescer bem nos meios mínimos testados, desenvolvendo-se um pouco melhor apenas no meio XVM2 com BSA (Figura 16D).

Estes resultados sugerem que o fato de o mutante $\Delta ntrC$ ter tido o pior crescimento em todos meios testados possa estar relacionado com o papel do gene *ntrC* como ativador transcricional de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio e na assimilação de amônia (JONSSON; NORDLUND, 2007), bem como, no caso da deficiência de crescimento desse mutante ter sido mais acentuada no meio XAM1 do que no XVM2 com BSA, que a presença ou ausência de algum componente no meio XAM1 possa ter prejudicado o seu desenvolvimento.

4.4 Formação de biofilme e produção de goma xantana *in vitro*

Na Figura 17, pode-se observar um aumento significativo ($p < 0,05$) na formação de biofilme *in vitro* pelo mutante $\Delta ntrC$, que foi duas vezes maior do que a XccA 306 e a do mutante $\Delta ntrB$. O mutante $\Delta ntrB$, por sua vez, não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) na formação de biofilme em relação à XccA 306, porém diferiu em relação ao mutante $\Delta ntrC$ ($p < 0,05$).

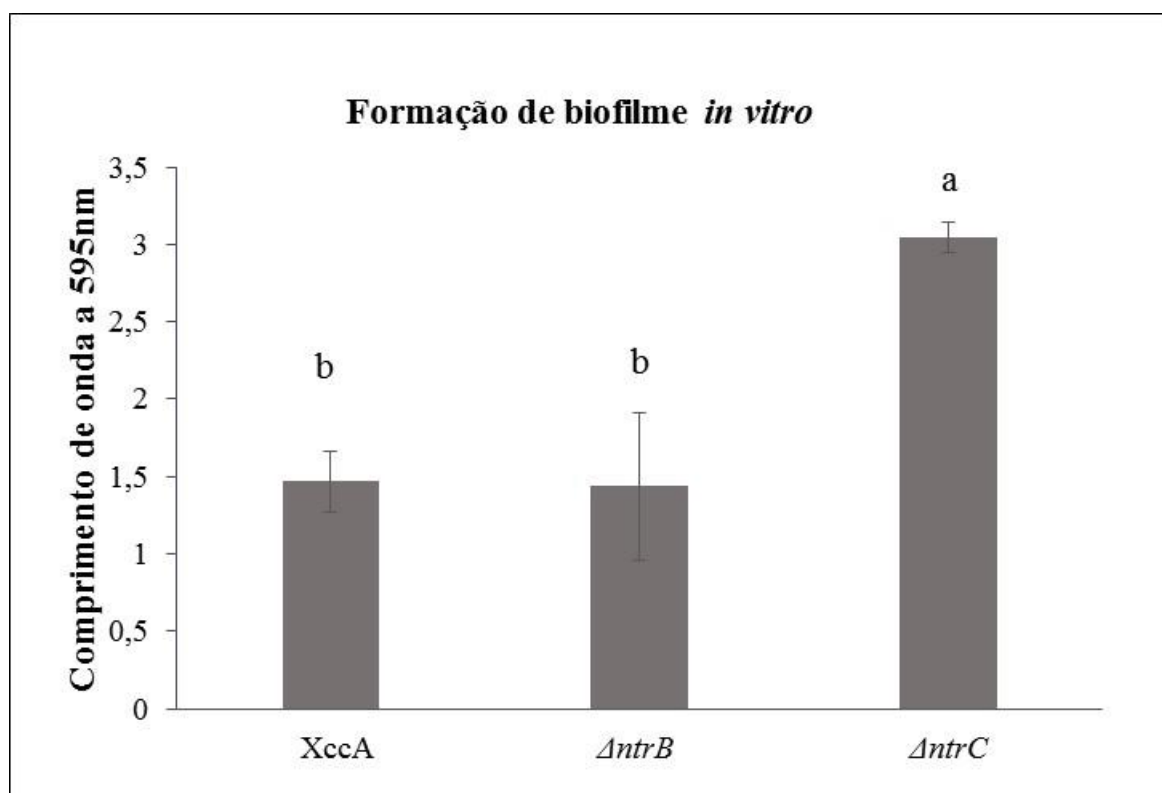


Figura 17. Quantificação da formação de biofilme *in vitro* pela XccA 306 e pelos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ por meio da leitura da densidade ótica (DO_{595nm}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Além da quantificação da formação de biofilme *in vitro*, foi também quantificada a produção de goma xantana. Na Figura 18A, verifica-se que a quantidade de goma xantana por massa de bactéria produzida pelo mutante $\Delta ntrC$ foi cinco vezes maior do que a produzida pela XccA 306 e três vezes e meia maior do que a produzida pelo mutante $\Delta ntrB$ ($p < 0,05$). Já o mutante $\Delta ntrB$ não

apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) na produção de goma xantana por massa de bactéria em relação à XccA 306.

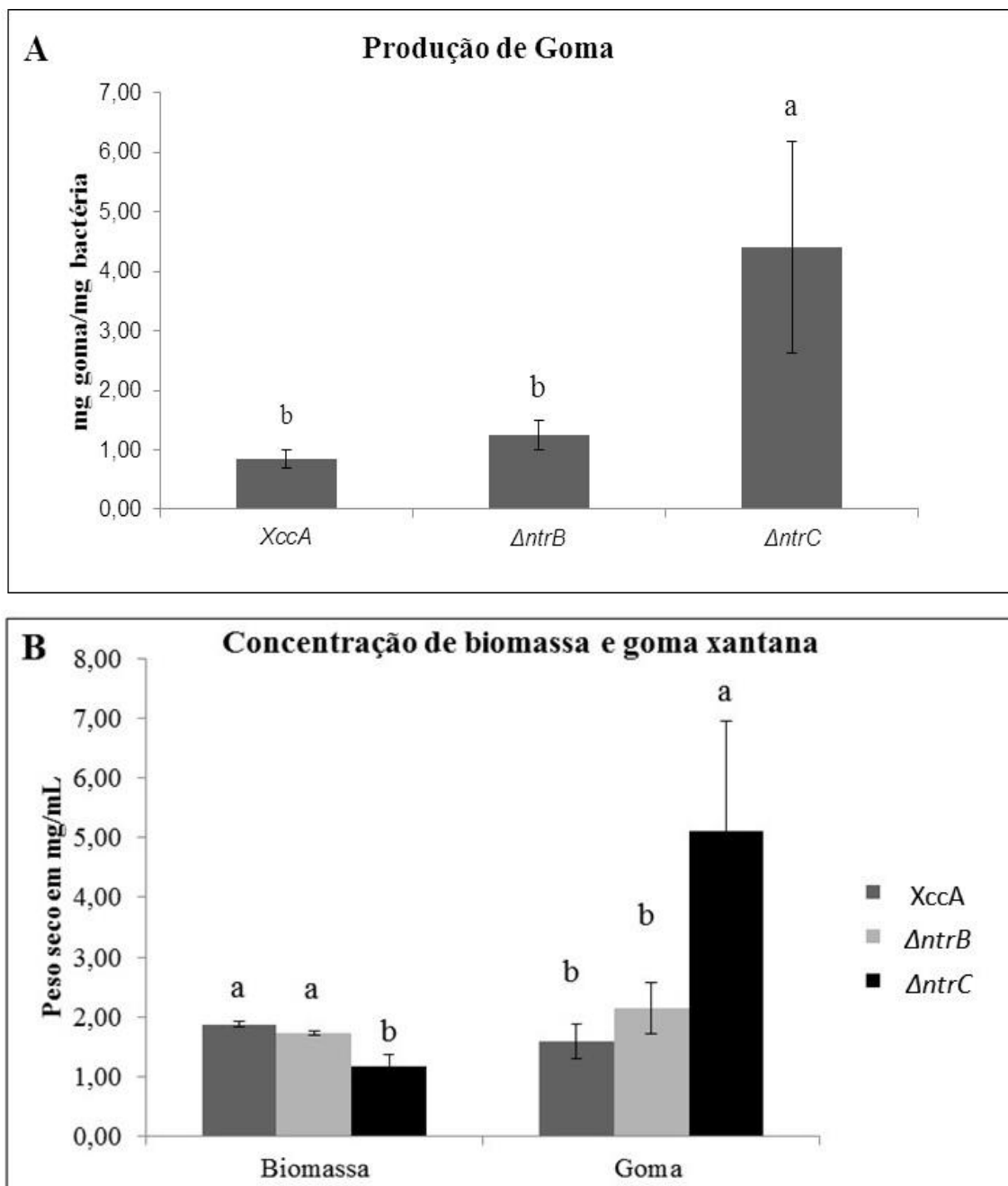


Figura 18. Produção de goma xantana por massa de bactéria (mg goma/mg bacteriana) pela XccA 306 e pelos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ (A). Concentração de biomassa e goma (mg/ml) na XccA 306 e nos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ (B). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

No entanto, apesar de a XccA 306 e o mutante $\Delta ntrB$ terem produzido quantidades de biomassa total significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao

mutante *ΔntrC* (Figura 18B), este produziu, em comparação à XccA e ao mutante *ΔntrB*, respectivamente três e duas vezes mais quantidade absoluta de goma ($p < 0,05$). Estes resultados indicam que o gene *ntrC* pode estar envolvido, indiretamente, na regulação da formação de biofilme e da produção de goma xantana.

4.5 Motilidade bacteriana tipo “swimming” e tipo “swarming”

Como se pode observar na Figura 19, não houve diferenças significativas entre as médias dos valores do diâmetro das colônias referentes às motilidades “swimming” e “swarming” da XccA 306 e as dos mutantes *ΔntrB* e *ΔntrC* pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados demonstram que a mutação desses genes pode não ter afetado o mecanismo de motilidade dependente de flagelo (motilidades “swimming” e “swarming”) da XccA 306, o que sugere que *ntrB* e *ntrC* provavelmente não estejam relacionados com os genes flagelares dessa bactéria.

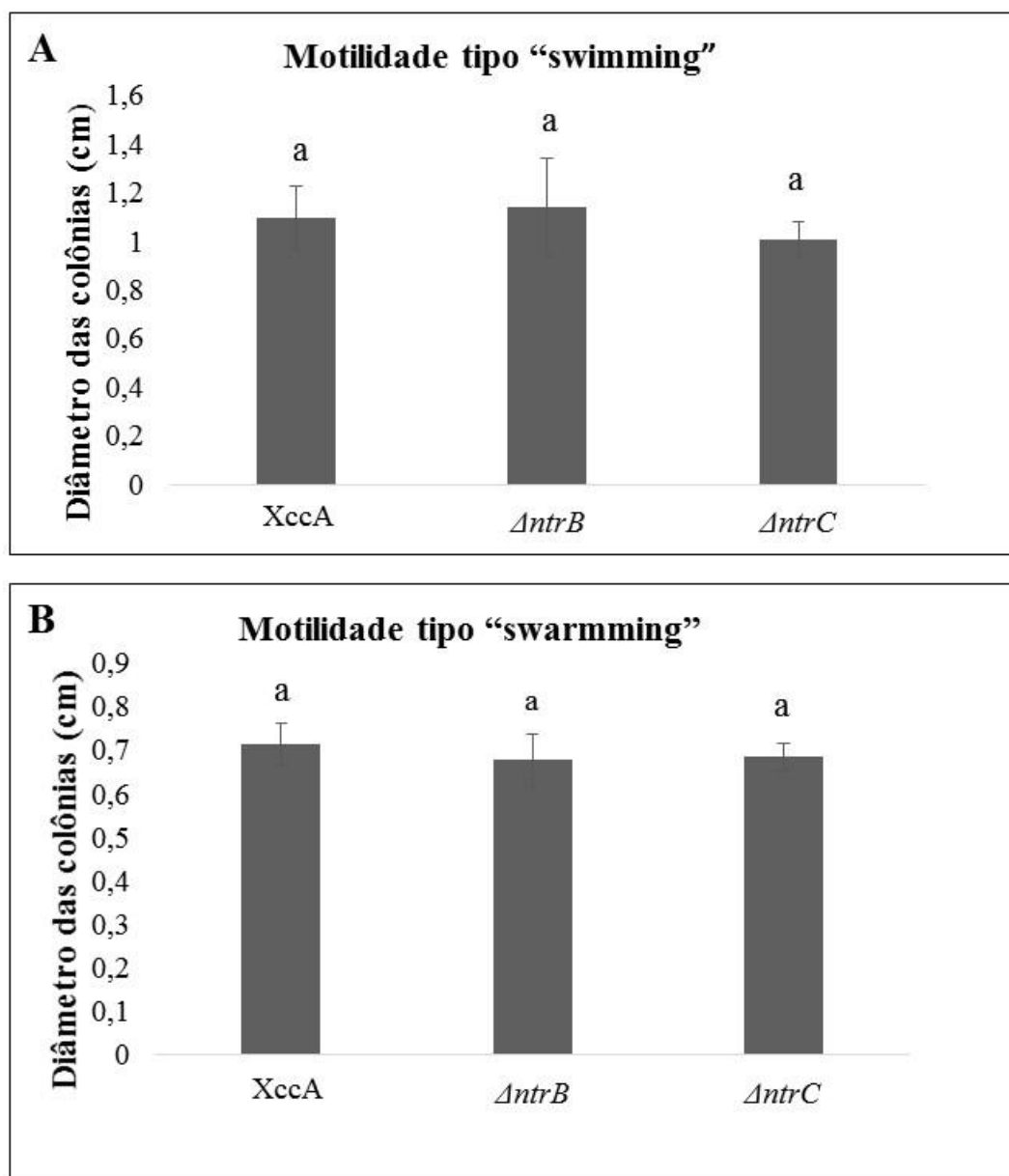


Figura 19. Teste de motilidade tipo “swimming” (A) e tipo “swarming” (B) realizado pela medição dos diâmetros das colônias da XccA 306 e dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.6 Expressão relativa dos genes do sistema de secreção tipo 3 (SST3)

Com base na análise da expressão relativa dos genes *hpa1*, *hrpG*, *hrpX*, *hrpE*, *hrpW* e *hrpD6*, que fazem parte do sistema de secreção tipo 3 (SST3), constatou-se que a expressão de todos genes avaliados foi significativamente maior ($p < 0,05$) no mutante $\Delta ntrC$ em comparação à XccA 306 e ao mutante $\Delta ntrB$ (Figura

20). Esses resultados sugerem que o gene *ntrC* também possa estar envolvido na regulação da expressão dos genes do SST3.

No entanto, o nível de expressão desses mesmos genes no mutante $\Delta ntrB$ não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à XccA 306 (Figura 20).

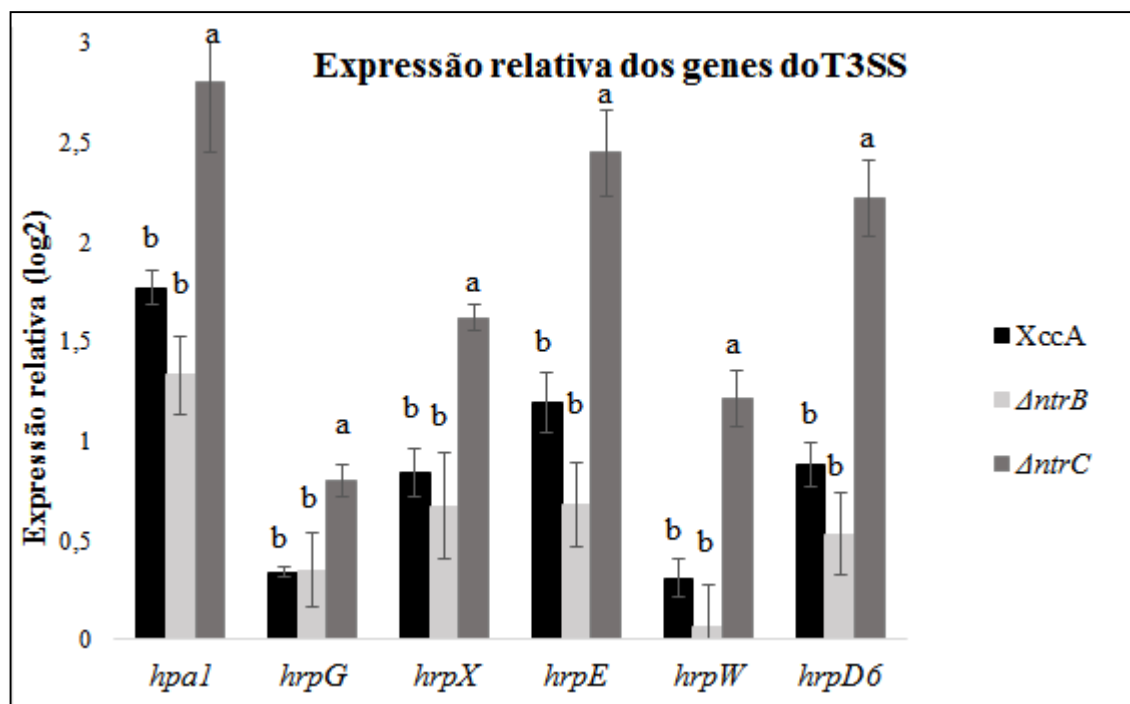


Figura 20. Expressão relativa dos genes *hpa1*, *hrpG*, *hrpX*, *hrpE*, *hrpW* e *hrpD6*, que fazem parte do sistema de secreção tipo 3 (SST3). Os valores do eixo Y ($\log_2$) indicam a expressão dos genes pela XccA e pelos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$, cultivados em meio líquido XVM2, em relação à XccA cultivada em meio líquido NB (controle). Médias seguidas pela mesma letra, para cada gene, não diferem significativamente pelo de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

4.7 Modelagem molecular das proteínas NtrC e HrpG

Para verificar o grau de similaridade entre as proteínas NtrC e HrpG da XccA 306 e investigar se a regulação do SST3 envolve uma possível fosforilação do regulador desse sistema (HrpG) mediada pela histidina quinase (NtrB), foi realizada a modelagem molecular das proteínas NtrC e HrpG.

Os modelos das estruturas moleculares obtidos para cada uma das proteínas analisadas encontram-se na Figura 21A. Com base na avaliação da qualidade estereoquímica desses modelos realizada por meio da análise do diagrama de

Ramachandran com a utilização do programa RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>), verificou-se que 84,7% e 88,5% dos resíduos de aminoácidos (aa) estão localizados em regiões favoráveis para NtrC e HrpG, respectivamente.

Esses resultados demonstram que os modelos estabelecidos para essas duas proteínas apresentaram valores de porcentagem de resíduos em regiões favoráveis um pouco abaixo do considerado satisfatório (> 90%) para um modelo de interação proteína-proteína de boa qualidade.

Na Figura 21B, pode-se observar o alinhamento tridimensional dos modelos de NtrC e HrpG com valor de “Root Mean Square Deviation” (RMSD) igual a 0,535 Å. Esse valor indica que as regiões receptoras dessas proteínas apresentam semelhança estrutural, já que quanto mais próximo de zero for o valor de RMSD, maior será a semelhança entre as estruturas das proteínas (MAIOROV; CRIPPEN, 1994). Portanto, os resultados sugerem que a fosforilação do regulador de resposta (HrpG) pela histidina quinase (NtrB) possivelmente possa ocorrer, visto que o valor de RMSD obtido (0,535 Å) indica que há similaridade entre as regiões receptoras dos reguladores de resposta NtrC e HrpG.

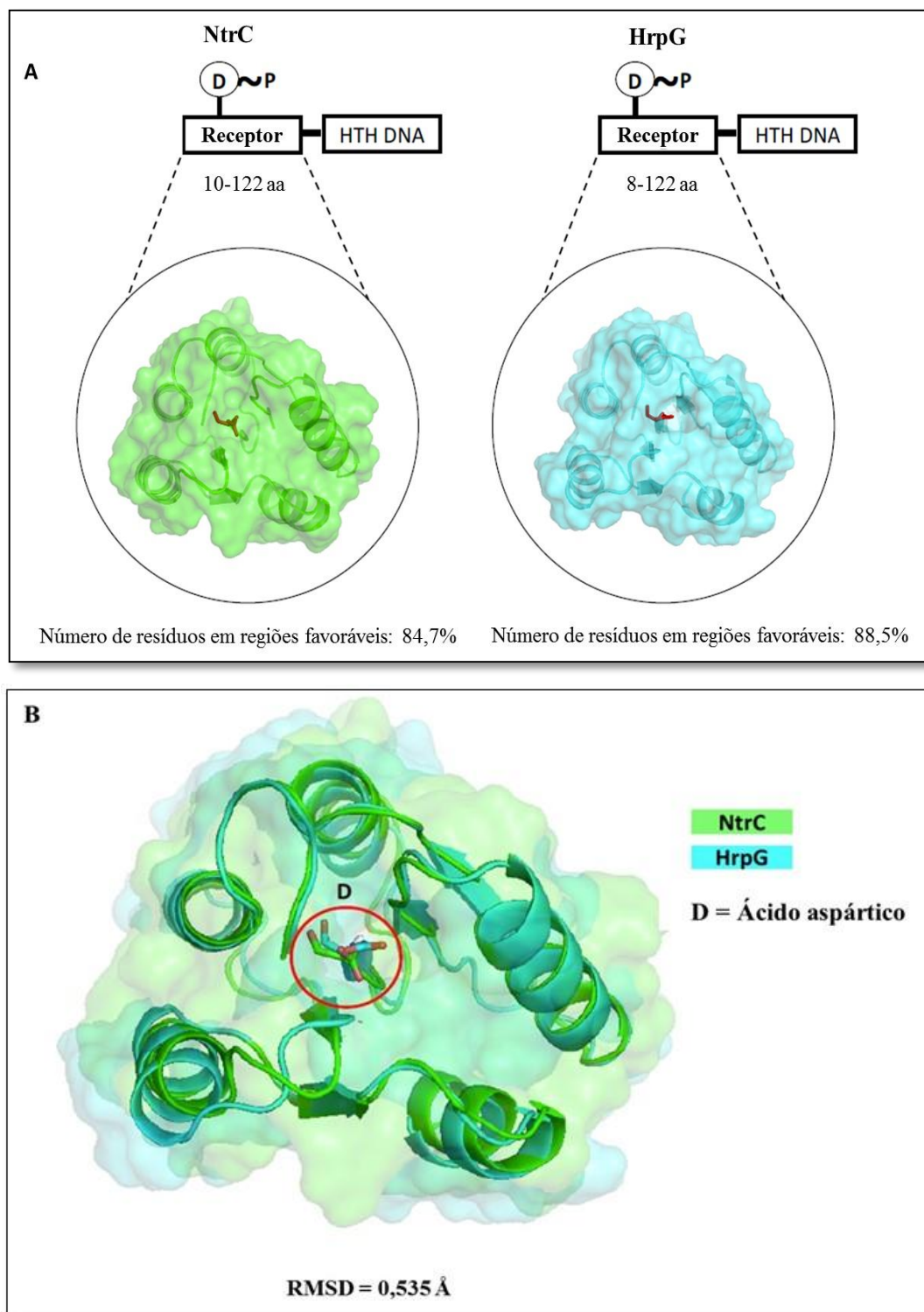


Figura 21. Modelagem molecular das proteínas NtrC e HrpG da XccA 306. Regiões modeladas em NtrC (região receptora: 10-122 aa) e HrpG (região receptora: 8-122 aa) que estão envolvidas no processo de fosforilação e valores de porcentagem de resíduos em regiões favoráveis iguais a 84,7% e 88,5%, respectivamente, para as proteínas NtrC e HrpG (A). Alinhamento tridimensional entre NtrC e HrpG com valor de “Root Mean Square Deviation” (RMSD) igual a 0,535 Å (B). D = domínio; P = fósforo; e HTH = domínio hélice-volta-hélice.

5 DISCUSSÃO

As proteínas histidina quinase (NtrB) e regulador de resposta (NtrC) compõem um sistema de dois componentes (TCS), que atua no sistema regulador de nitrogênio (NTR), e são codificadas, respectivamente, pelos genes *ntrB* e *ntrC* (MERRICK; EDWARDS, 1995; ZHANG; POHLMANN; ROBERTS, 2005; LIU et al., 2017). NtrB e NtrC de XccA são homólogas às proteínas NtrB e NtrC de *Escherichia coli*, com 35% e 52% de identidade de sequência, respectivamente (ANDRADE et al., 2006). A NtrB contém os domínios Per-ARNT-Sim (PAS) e histidina quinase (HK) (ANDRADE et al., 2006); já a NtrC apresenta três domínios funcionais característicos: o domínio receptor (Rec) N-terminal, o domínio de interação central σ^{54} ou domínio AAA⁺ e o domínio de ligação ao DNA C-terminal ou domínio hélice-volta-hélice (HTH) (PANDEY et al., 2016).

No presente estudo, o efeito dos genes *ntrB* e *ntrC* na virulência da XccA 306 foi demonstrado por meio dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$; pois, quando inoculados em folhas de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), causaram redução na sintomatologia do cancro cítrico e diminuição da população bacteriana no espaço intercelular do tecido foliar da planta (Figuras 12, 13A, 14 e 15A). Resultados semelhantes também foram observados, em XccA 306, para outros sistemas de dois componentes, como ColR/ColS (YAN; WANG, 2011), RpfC/RpfG (GUO et al., 2012), ExsF/ExsG (COSTA, 2015) e PhoR/PhoB (RODAS MENDOZA, 2016).

Em pesquisas anteriores com outros genes também envolvidos no metabolismo do nitrogênio, tais como: *gltB*, *gltD* e *glnB*, foram obtidos resultados similares (YAN; WANG, 2011; PANDEY et al., 2014, SONG et al., 2015). Os genes *gltB* e *gltD* codificam as subunidades α e β de glutamato sintetase, respectivamente; enquanto o gene *glnB* codifica a proteína trimérica PII, que atua na modulação da atividade dos genes *ntrB/ntrC* em resposta aos níveis de nitrogênio no interior das células (YAN; WANG, 2011; PANDEY et al., 2014, SONG et al., 2015).

Em adição, os resultados das curvas de crescimento e do teste de patogenicidade indicam que o gene *ntrB* desempenhe indiretamente papel na multiplicação e na virulência da XccA 306 em limão-cravo, visto que a ausência desse gene não alterou a viabilidade da bactéria *in vitro* (Figura 13B). No entanto, a

mutação do gene *ntrC* afetou o “fitness” bacteriano da XccA 306 em meio de cultura definido e *in planta* (Figura 15), o que pode ter comprometido o desenvolvimento da bactéria e, consequentemente, a sua virulência, com redução da capacidade de multiplicação celular e de produção dos sintomas da doença. Isto porque, na sua forma ativa (fosforilada), a NtrC é responsável pela regulação de genes envolvidos na assimilação de amônia e no metabolismo do nitrogênio (ZHANG et al., 1995; JONSSON; NORDLUND, 2007), bem como pela regulação de promotores dependentes de σ^{54} (RpoN) (LIU et al., 2017) e de redes metabólicas centrais (FRANCK et al., 2015).

Quando submetido ao crescimento nos meios mínimos de composição conhecida XAM1 e XVM2, com e sem a adição de albumina sérica bovina (BSA), o mutante $\Delta ntrC$ teve o pior desempenho de crescimento em ambos os meios quando comparado à XccA 306 e ao do mutante $\Delta ntrB$; essa deficiência de crescimento foi mais acentuada no meio XAM1 (Figuras 16A e B), sugerindo que a presença ou ausência de algum componente nesse meio possa ter prejudicado o seu desenvolvimento. Isto porque os meios mínimos simulam as condições do apoplasto das células vegetais, um ambiente nutricionalmente limitado, em que a bactéria é estressada não só pela limitação de nutrientes, mas também pelos agentes de defesa da planta (RICO; JONES; PRESTON, 2009; SENA-VÉLEZ et al., 2015). Outra explicação para isso seria que a mutação do gene *ntrC* tenha afetado o desempenho do mutante $\Delta ntrC$; uma vez que o *ntrC* atua como ativador transcricional de genes envolvidos na assimilação de amônia e no metabolismo do nitrogênio (JONSSON; NORDLUND, 2007), como, por exemplo, o gene *glnA*, que codifica a glutamina sintetase (GlnA) (ZHANG et al., 1995), enzima chave para a assimilação da amônia durante o processo de formação de glutamina a partir dos compostos glutamato e amônia (REITZER, 2003).

Por sua vez, a tendência de crescimento semelhante ao da XccA 306 em todas as condições testadas apresentada pelo mutante $\Delta ntrB$ (Figuras 16A, B, C e D) pode ser devida ao fato de que, mesmo com a inativação da histidina-quinase (NtrB), a ativação do regulador de resposta NtrC por fosforilação possa continuar acontecendo pelo processo “cross-talk” por outra histidina-quinase, como ocorre em

outras bactérias (YAMAMOTO et al.; 2005; DREPPER et al., 2006; LAUB; GOULIAN, 2007).

A formação de biofilme é um processo importante em patógenos bacterianos e necessária para a obtenção de máxima virulência na XccA, pois desempenha um papel fundamental nas interações com o hospedeiro (ZIMARO et al., 2014; GRANATO et al., 2016; ARTIER et al., 2018). Os biofilmes microbianos geralmente são definidos como conglomerados de células imobilizadas em uma matriz de polímero orgânico de origem microbiana, constituída principalmente por polissacarídeos extracelulares (EPS), além de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (RIGANO et al., 2007). As *Xanthomonas* spp. produzem um EPS característico: a goma xantana, que dá a aparência mucoide às colônias bacterianas. Curiosamente, os genes envolvidos na síntese de goma xantana na XccA são dispensáveis para o crescimento bacteriano e a formação de sintomas do cancro em *Citrus sinensis*, mas contribuem para a virulência bacteriana em *Citrus limon* (BÜTTNER; BONAS, 2010), sugerindo que a contribuição desse EPS para a virulência possa depender da planta hospedeira e das condições ambientais (DUNGER et al., 2007; RIGANO et al., 2007; BÜTTNER; BONAS, 2010).

Neste estudo, foi possível observar uma maior capacidade de formação de biofilme e de produção de goma xantana *in vitro* pelo mutante $\Delta ntrC$ quando comparado com a XccA 306 (Figuras 17 e 18). Porém, não houve alteração na formação de biofilme e na produção de goma xantana *in vitro* com a mutação no gene *ntrB* em relação à XccA 306. A maior quantidade de goma xantana produzida pode estar relacionada com o aumento da formação de biofilme *in vitro*, visto que a xantana é requerida para a formação de biofilme, além de ter papel importante em várias etapas desse processo em XccA (RIGANO et al., 2007). Esses resultados indicam que o gene *ntrC* pode estar envolvido na regulação da formação de biofilme e da produção de goma xantana e/ou que a ausência desse gene ocasione um desequilíbrio celular na XccA 306.

O envolvimento do regulador NtrC na produção de EPS e na formação de biofilme foi investigado em *Vibrio vulnificus* (KIM et al., 2007; KIM et al., 2009). Kim et al. (2007) sugeriram que a NtrC atua como um regulador chave na formação de biofilme, modulando a biossíntese de lipopolissacarídeos (LPS) e EPS por meio do

controle da expressão do gene que codifica uma ADP-glicero-mano-heptose-6-epimerase. Kim et al. (2009) demonstraram que os EPS regulados por NtrC são cruciais na formação de biofilme e que alguns componentes de EPS desempenham papéis importantes na interação com hospedeiros. Recentemente em XccA 306, YARYURA et al., 2015 relataram que a NtrC juntamente com as proteínas XbmR (XAC3733/XAC_RS18865) e XAC0226/XAC_RS01180 pertencem à família NtrC de ativadores transcricionais. Família essa que está envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos, como metabolismo do nitrogênio, produção de EPS, formação de biofilme e motilidade, em várias bactérias (YARYURA et al., 2015; PANDEY et al., 2016).

O aumento da produção de goma xantana e da formação de biofilme também foi relatado em pesquisas realizadas com outros genes em XccA 306 (ANDRADE, 2006; GRANATO, 2016). Andrade (2006) verificou que a mutação do gene *cmfA* (XAC_RS01725), responsável pela codificação da proteína CMF que desempenha papel relevante no processo “quorum-sensing”, promoveu maior produção de goma xantana e alteração na patogenicidade, com redução de hiperplasia, em plantas de laranja-doce e limão-cravo. Granato (2016) relatou que a mutação do gene XAC0292 (XAC_RS01525), que codifica uma proteína hipotética, resultou em maior produção de goma xantana, formação de biofilme *in vitro* e redução do crescimento bacteriano e, conseqüentemente, no desenvolvimento de sintomas mais lento em relação à estirpe selvagem, em plantas de laranja-doce.

O considerável aumento de produção de goma xantana resultante da mutação do gene *ntrC*, constatado no presente estudo, pode vir a ser de grande importância biotecnológica, caso a mutação desse gene tenha efeito semelhante em *Xanthomonas campestris*, que é a bactéria utilizada comercialmente para a produção de goma xantana.

Para muitas bactérias, a motilidade é considerada um fator importante para a formação de biofilmes (MALAMUD et al., 2013). Entretanto, a mutação dos genes *ntrB* e *ntrC* não promoveu mudança na motilidade dependente de flagelo (motilidade “swimming” e “swarming”) dos mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$ em comparação à da XccA (Figura 19). Resultado que indica que a mutação desses genes pode não ter afetado a capacidade de motilidade dependente de flagelo da XccA 306 e que,

consequentemente, *ntrB* e *ntrC* não estejam envolvidos com os genes flagelares dessa bactéria. Fato que também foi verificado por Granato (2016) em relação à motilidade tipo “swimming” com a mutação do gene XAC0292.

Por meio dos resultados obtidos para os mutantes $\Delta ntrB$ e $\Delta ntrC$, demonstra-se que a produção de goma xantana não interferiu nas motilidades “swimming” e “swarming” da XccA 306. Esses resultados são corroborados pelos obtidos por Malamud et al. (2011) que, investigando o efeito da mutação do gene *gumB* (XAC_RS13165) envolvido com a síntese de EPS, constataram que o mutante *gumB* apresentou motilidade “swimming” semelhante à da XccA selvagem, indicando que a xantana provavelmente não tenha papel nesse tipo de motilidade. Dunger et al. (2007) sugeriram ainda que a xantana não desempenhe um papel essencial no cancro cítrico nos estágios iniciais da infecção ou nas interações incompatíveis entre a XccA e as plantas não hospedeiras; mas facilite a manutenção das bactérias na planta hospedeira, possivelmente melhorando a eficiência da colonização de tecidos distantes.

As bactérias patogênicas utilizam o sistema de secreção tipo 3 (SST3) para injetar fatores de virulência (efetores) diretamente nas células hospedeiras e, assim, influenciar as atividades dessas células a seu favor, promovendo a proliferação bacteriana e o desenvolvimento da doença (BÜTTNER; BONAS, 2010; HAUSNER et al., 2017). A expressão dos genes *hrpG* e *hrpX* reguladores do SST3, do gene *hrpW* e de alguns do “cluster” *hrp* (*hpa1*, *hrpE* e *hrpD6*) avaliados foi maior no mutante $\Delta ntrC$ do que na XccA 306 e no mutante $\Delta ntrB$ (Figura 20). Esse resultado sugere que, assim como o gene *ntrC* poderia regular os mecanismos de formação de biofilme e produção de goma xantana, ele possa também atuar na regulação da expressão de genes do SST3 e/ou que a ausência desse gene ocasione um desequilíbrio celular na XccA 306, resultando na alteração desses mecanismos. No entanto, o nível de expressão desses mesmos genes (*hpa1*, *hrpG*, *hrpX*, *hrpE*, *hrpW* e *hrpD6*) no mutante $\Delta ntrB$ não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à XccA 306.

Para verificar o grau de similaridade entre as proteínas NtrC e HrpG da XccA 306 e investigar se a regulação do SST3 envolve a possível fosforilação do regulador desse sistema (HrpG) mediada pela HK NtrB, foi realizada a modelagem

molecular das proteínas NtrC e HrpG (Figura 21). Os resultados obtidos a partir da modelagem molecular dessas proteínas demonstraram a existência de semelhança estrutural entre os reguladores de resposta NtrC e HrpG, reforçando a hipótese de que a fosforilação de HrpG por NtrB possa ocorrer, conforme é ilustrado em esquema proposto e apresentado na Figura 22.

Porém, outras hipóteses levantadas (LEE et al., 2008; YOSHIMUCHI et al., 2009; RODAS MENDOZA, 2016) propõem que a ativação de HrpG também possa ocorrer por múltiplas vias e sinais ambientais, ainda a serem esclarecidos e testados. RODAS MENDOZA (2016), estudando o sistema de dois componentes PhoR/PhoB em XccA 306, demonstrou, a partir dos resultados de qRT-PCR e modelagem molecular, que há semelhança estrutural entre as regiões receptoras de PhoB e HrpG, assim como ocorre uma possível modulação da expressão de *hrpX* via ativação de *hrpG* regulada pelo sistema de dois componentes PhoR/PhoB.

Estudos de interação proteína-proteína com o regulador de resposta HrpG também foram realizados. Alegria (2004), por exemplo, com intuito de identificar interações proteína-proteína envolvidas em processos de patogenicidade na XccA, por meio da utilização de sistema de duplo-híbrido de levedura, mostrou novas interações proteína-proteína, como a interação entre HrpG e as proteínas hipotéticas XAC0095 e XAC1568; bem como a interação entre esse regulador de resposta e uma possível proteína sensora histidina XAC3683.

Os resultados obtidos neste estudo contribuem para o avanço do conhecimento sobre o papel dos genes *ntrB* e *ntrC* no desenvolvimento do cancro cítrico A e na virulência da XccA 306 em limão-cravo, bem como na formação de biofilme, na produção de goma xantana, na motilidade bacteriana e na regulação da expressão de importantes genes de virulência. Contudo, são necessários estudos adicionais para elucidar os mecanismos envolvidos na regulação da formação de biofilme e da produção de goma xantana por esses genes e para comprovar a ocorrência da fosforilação de HrpG via NtrB por meio de experimentos *in vitro*.

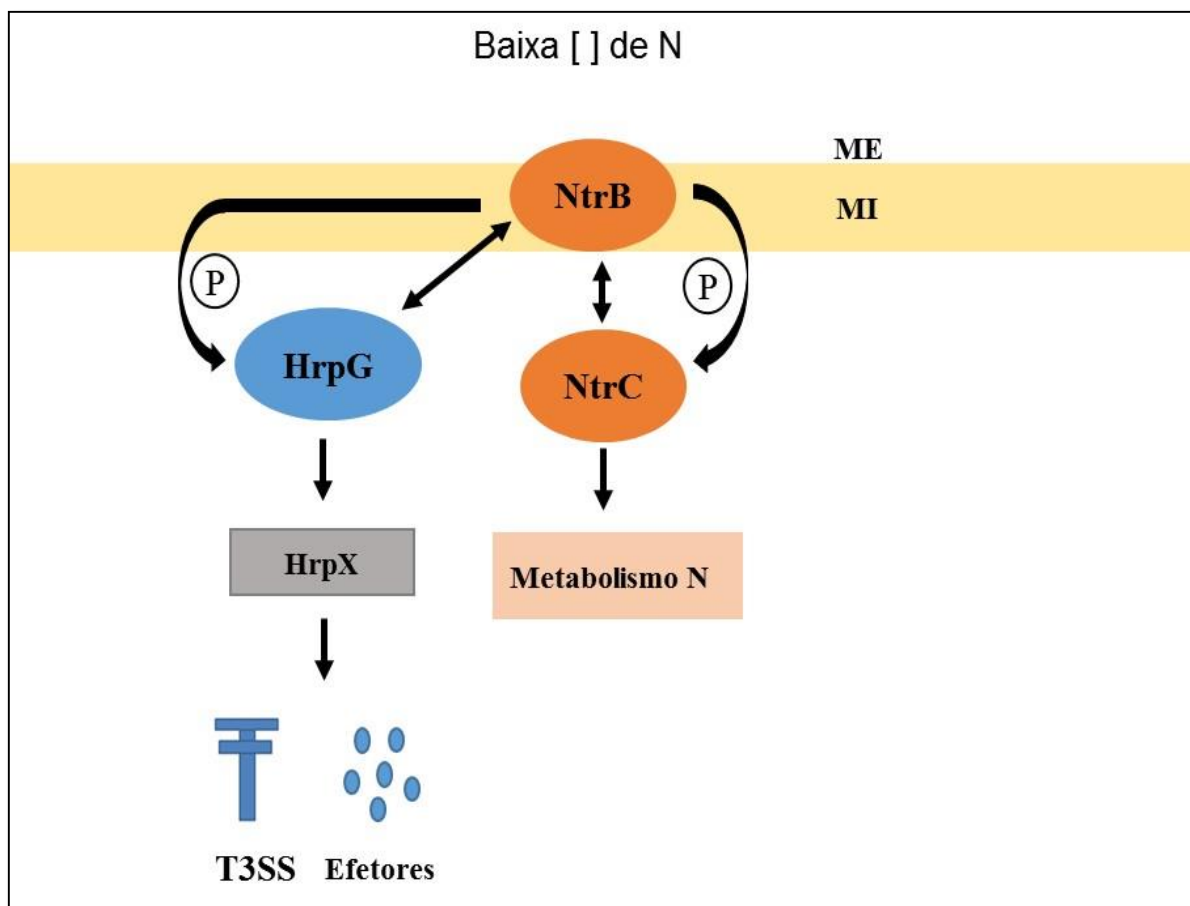


Figura 22. Esquema representativo da fosforilação do HrpG pela histidina quinase (HK NtrB) que atua no sistema regulador do nitrogênio (NTR). Em baixas concentrações de nitrogênio extracelular (N), a NtrB fosforila os reguladores de resposta NtrC e HrpG, ativando-os. NtrC fosforilado promove a expressão de genes envolvidos no metabolismo de N; enquanto HrpG, na forma ativa, induz a transcrição de *hrpX*, que ativa a expressão de um grande conjunto de genes de virulência. Esse conjunto de genes codifica o SST3 e os efetores do SST3 (eSST3). Em presença de altas concentrações de N extracelular, a NtrB estimula a desfosforilação de NtrC e HrpG, inativando-os, o que reprime a expressão de genes envolvidos no metabolismo de N e de genes do SST3. MI = membrana interna; ME = membrana externa; e P = fósforo. Setas de dupla ponta indicam interação entre as proteínas.

6 CONCLUSÕES

O gene *ntrB* e *ntrC* desempenham papel na multiplicação e na capacidade de produção dos sintomas da bactéria XccA 306 durante o desenvolvimento do cancro cítrico A em limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck).

O crescimento do mutante $\Delta ntrC$ é comprometido nos meios mínimos devido à ausência do gene *ntrC* que atua como ativador transcricional de genes envolvidos na assimilação de amônia e no metabolismo do nitrogênio.

O gene *ntrC* pode atuar na regulação dos mecanismos de formação de biofilme, produção de goma xantana e expressão de genes do sistema de secreção tipo 3 (SST3) e/ou a ausência desse gene pode ocasionar um desequilíbrio celular na XccA 306, o que resulta na alteração desses mecanismos. Enquanto, NtrB pode apresentar papel na regulação de genes do SST3 por meio da fosforilação de HrpG. Além disso, *ntrB* e *ntrC* podem não estar envolvidos no mecanismo de motilidade dependente de flagelo da XccA 306.

7 REFERÊNCIAS

ABE, V. Y.; BENEDETTI, C. E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 8, p. 1223-1236, 2016.

AGRIANUAL. **Laranja**. In: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: IEG/FNP, 2017. p. 225-265.

ALEGRIA, M. C. **Identificação de interações proteína-proteína envolvendo os produtos dos Loci *hrp*, *vir* e *rpf* do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2004. 210 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

ALVA, A. K. Copper contamination of sandy soils and effects on young Hamlin orange trees. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 6, p. 857-864, 1993.

AMARAL, S.F do. Providências para a erradicação do cancro cítrico. **O Biológico**, v. 23, n. 6, p. 112-123, 1957.

AMARAL, A. M.; TOLEDO, C. P.; BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 292-294. 2004.

ANDRADE, M. O. da. **Caracterização bioquímica interação proteína-proteína relacionada com o mecanismo de *quorum-sensing* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2006. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, 2006.

ANDRADE, M. O.; ALEGRIA, M. C.; GUZZO, C. R.; DOCENA, C.; ROSA, P.; CLAUDIA, M.; FARAH, C. S. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf *quorum-sensing* pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 537-551, 2006.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80-105, 2001.

ARTIER, J.; ZANDONADI, F. da S.; CARVALHO, F. M. de S.; PAULETTI, B. A.; LEME, A. F. P.; CARNIELLI, C. M.; OLIVEIRA, J. C. F de. Comparative proteomic analysis of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* periplasmic proteins reveals changes in cellular envelope metabolism during in vitro pathogenicity induction. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 1, p. 143-157, 2018.

ATKINSON, M. R.; NINFA, A. J. Role of the GlnK signal transduction protein in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 431-447, 1998.

BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A.; HOME, R. A.; TORRES, P. S.; VOJNOV, A. A.; AMARAL, A. M. D. Mutation in the xpsD gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 146-153, 2010.

BARBOSA, J. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; MASSARI, C. A.; AYRES, A. J. Incidência e distribuição de cancro cítrico em pomares comerciais do Estado de São Paulo e sul do Triângulo Mineiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 30-35, 2001.

BEIER, D.; GROSS, R. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 143-152, 2006.

BEHLAU, F.; BELASQUE JR, J.; GRAHAM, J. H.; LEITE JR, R. P. Effect of frequency of copper applications on control of citrus canker and the yield of young bearing sweet orange trees. **Crop Protection**, v. 29, n. 3, p. 300-305, 2010.

BEHLAU, F.; BELASQUE JUNIOR, J. **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Araraquara: Fundecitrus, 2014. 82 p. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manuais>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BEHLAU, F.; SALA, I.; BASSANEZI, R. B. **Cancro cítrico: medidas essenciais de controle**. 3. ed. Araraquara: Fundecitrus, 2017. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manuais>>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BELASQUE JUNIOR, J.; FERNANDES, N. G.; MASSARI, C. A. O sucesso da campanha de erradicação do cancro cítrico no estado de São Paulo, Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 91-92, 2009.

BIJLSMA, J. J. E.; GROISMAN, E. A. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 8, p. 359-366, 2003.

BITANCOURT, A. A. O Cancro Cítrico. **O Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 101-111, 1957.

BOURRET, R. B.; SILVERSMITH, R. E. Two-component signal transduction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 113, 2010.

BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, v. 292, p. 2275-2278, 2001.

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

BUSH, M.; DIXON, R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ^{54} -dependent transcription. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 3, p. 497-529, 2012.

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010.

CAICEDO, J. C.; VILLAMIZAR, S.; FERRO, J. A. Quorum sensing, its role in virulence and symptomatology in bacterial citrus canker. In: GILL, H.; GARG, H. **Citrus pathology**. London: InTech, 2017. cap 4. p. 71-88.

CAPPELLETTI, P. A. **Identificação e análise funcional de interações proteína-proteína do sistema de secreção do tipo III do *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2010. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

CARVALHO, F. M. de S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira.** 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CHEUNG, J.; HENDRICKSON, W. A. Sensor domains of two-component regulatory systems. **Current opinion in microbiology**, v. 13, n. 2, p. 116-123, 2010.

COLETTA-FILHO, H. D.; TAKITA, M. A.; SOUZA, A. A.; NETO J. R.; DESTEFANO, S. A. L.; HARTUNG, J. S.; MACHADO, M. A. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 279–285, 2006.

CONSTANTIN; E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S.; VAN MALDERGHEM, C.; DE VOS, P.; COTTYN, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v. 65, p. 792-806, 2016.

COOKSEY, D. A. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 381-386, 1994.

COSTA, M. L. M. da. **Análise funcional dos genes *exsF* e *exsG* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.** 2015. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2015.

DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; AMARAL, A.M. do; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A.J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A.M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; SOUZA, R. F. de; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; SANTOS, M. T. dos; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459-63, 23 2002.

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

DREPPER, T.; WIETHAUS, J.; GIAOURAKIS, D.; GROß, S.; SCHUBERT, B.; VOGT, M.; WIENCEK, Y.; MCEWAN, A. G.; MASEPOHL, B. Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 2, p. 250-256, 2006.

DUNGER, G.; RELLING, V. M.; TONDO, M. L.; BARRERAS, M.; IELPI, L.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives of Microbiology**, v. 188, n. 2, p. 127-135, 2007.

FAVARO, M. A.; ROESCHLIN, R. A.; RIBERO, G. G.; MAUMARY, R. L.; FERNANDEZ, L. N.; LUTZ, A.; GARIGLIO, N. F. Relationships between copper content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments. **Crop Protection**, v. 92, p. 182-189, 2017.

FAWCETT, H. S.; JENKINS, A. E. Records of citrus canker from herbarium specimens of the genus *Citrus* in England and the United States. **Phytopathology**, v. 23, n. 5, p. 820-824, 1933.

FEICHTENBERGER, E.; MULLER, G. W.; GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Ed). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, p. 261-296.

REFERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; JONES, J. B. Recent advances in understanding *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 1-17, 2018.

FERREIRA, C. B.; MOREIRA, L. M.; BRIGATI, J. B.; LIMA, L. L.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; OLIVEIRA, J. C. de. Identification of new genes related to virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* during citrus host interactions. **Advances in Microbiology**, v. 7, n. 01, p. 22, 2017.

FERREIRA, T.; RASBAND, W. **ImageJ user guide**. 2012. 198 p. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2017.

FRANCK, W. L.; QIU, J.; LEE, H. I.; CHANG, W. S.; STACEY, G. DNA microarray-based identification of genes regulated by NtrC in *Bradyrhizobium japonicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5299-5308, 2015.

FRANCKE, C.; KORMELINK, T. G.; HAGEMEIJER, Y.; OVERMARS, L.; SLUIJTER, V.; MOEZELAAR, R.; SIEZEN, R. J. Comparative analyses imply that the enigmatic Sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 385, 2011.

GISLASON, A. S.; CHOY, M.; BLOODWORTH, R. A.; QU, W.; STIETZ, M. S.; LI, X.; CARDONA, S. T. Competitive growth enhances conditional growth mutant sensitivity to antibiotics and exposes a two-component system as an emerging antibacterial target in *Burkholderia cenocepacia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. e00790-16, 2017.

GOCHEZ, A. M.; HUGUET-TAPIA, J. C.; MINSAVAGE, G. V.; SHANTARAJ, D.; JALAN, N.; STRAUß, A.; LAHAYE, T.; WANG, N.; CANTEROS, B. I.; JONES, J. B.; POTNIS, N. Pacbio sequencing of copper-tolerant *Xanthomonas citri* reveals presence of a chimeric plasmid structure and provides insights into reassortment and shuffling of transcription activator-like effectors among *X. citri* strains. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 16, 2018.

GOTTWALD, T. R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J. H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: the scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, v. 91, n.1, p. 30-4, 2001.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 10, p. 1-32, 2002.

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.

GRANATO, L. M. **Functional characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* genes involved with exopolysaccharides production, biofilm formation and pathogenicity**. 2016. 119 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2016.

GRANATO, L. M.; PICCHI, S. C.; DE OLIVEIRA ANDRADE, M.; TAKITA, M. A.; DE SOUZA, A. A.; WANG, N.; MACHADO, M. A. The ATP-dependent RNA helicase HrpB plays an important role in motility and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 55, 2016.

GROISMAN, E. A. Feedback control of two-component regulatory systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 70, p. 103-124, 2016.

GUO, Y. P.; FIGUEIREDO, F.; JONES, J.; WANG, N. HrpG and HrpX play global roles in coordinating different virulence traits of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 24, n. 6, p. 649-661, 2011.

GUO, Y.; SAGARAM, U. S.; KIM, J-S.; WANG, N. Requirement of the *galU* gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth *in planta* of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2234-2242, 2010.

GUO, Y.; ZHANG, Y.; LI, J. L.; WANG, N. Diffusible signal factor-mediated quorum sensing plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 25, n. 2, p. 165-179, 2012.

HAUSNER, J.; HARTMANN, N.; JORDAN, M.; BÜTTNER, D. The predicted lytic transglycosylase HpaH from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associates with the type III secretion system and promotes effector protein translocation. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 2, p. e00788-16, 2017.

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G. (Ed). **Food biotechnology**: microorganisms. New York: VCH Publishers, 1995. chap. 12, p. 495-514.

HERVÁS, A. B.; CANOSA, I.; SANTERO, E. Transcriptome analysis of *Pseudomonas putida* in response to nitrogen availability. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 416-420, 2008.

HERVÁS, A. B.; CANOSA, I.; LITTLE, R.; DIXON, R.; SANTERO, E. NtrC-dependent regulatory network for nitrogen assimilation in *Pseudomonas putida*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 6123-6135, 2009.

HUSSAIN, H.; CHONG, N. F. Combined overlap extension PCR method for improved site directed mutagenesis. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. **Produção Agrícola municipal – 2016**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>>. Acesso em: 15 mai. 2017.

JACOB, T. R.; LAIA, M. L.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T. Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*. **Biotechnology Letters**, New York, v. 33, n. 6, p. 1177-1184, 2011.

JACOB, T. R.; LAIA, M. L. D.; MOREIRA, L. M.; GONÇALVES, J. F.; CARVALHO, F. M. D. S.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. A. Type IV secretion system is not involved in infection process in citrus. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

JALAN, N.; YAN, Q.; KOGENARU, S.; GUO, Y.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WANG, N. Genomics of *Xanthomonas citri* and related species. In: GROSS, D. C.; LICHENS-PARK, A.; KOLE, C. (Ed.). **Genomics of plant-associated bacteria**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. chap. 7, p. 151-176.

JONSSON, A.; NORDLUND, S. In vitro studies of the uridylylation of the three PII protein paralogs from *Rhodospirillum rubrum*: the transferase activity of *R. rubrum* GlnD is regulated by α -ketoglutarate and divalent cations but not by glutamine. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 9, p. 3471-3478, 2007.

KIM, H. S.; LEE, M.; CHUN, S. J.; PARK, S. J.; LEE, K. H. Role of NtrC in biofilm formation via controlling expression of the gene encoding an ADP-glycero-manno-heptose-6-epimerase in the pathogenic bacterium, *Vibrio vulnificus*. **Molecular microbiology**, v. 63, n. 2, p. 559-574, 2007.

KIM, H. S.; PARK, S. J.; LEE, K. H. Role of NtrC-regulated exopolysaccharides in the biofilm formation and pathogenic interaction of *Vibrio vulnificus*. **Molecular microbiology**, v. 74, n. 2, p. 436-453, 2009.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. I. T.; SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. F. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, Jaboticabal, v. 9, n. 12, p. 1-17, 2009.

LAUB, M. T.; GOULIAN, M. Specificity in two-component signal transduction pathways. **Annual Review of Genetics**, v. 41, p. 121-145, 2007.

LEE, J.; LEE, H. J.; SHIN, M. K.; RYU, W. S. Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. **BioTechniques**, v. 36, n. 3, p. 398-400, 2004.

LEE, S. W.; JEONG, K. S.; HAN, S. W.; LEE, S. E.; PHEE, B. K.; HAHN, T. R.; RONALD, P. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PhoPQ two-component system is required for AvrXA21 activity, hrpG expression, and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 6, p. 2183-2197, 2008.

LEE, I. J.; KIM, K. W.; HYUN, J. W.; LEE, Y. H.; PARK, E. W. Comparative ultrastructure of nonwounded Mexican lime and Yuzu leaves infected with the citrus canker bacterium *Xanthomonas citri* pv. *citri*. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 7, p. 507-516, 2009.

LEE J., SHIN M. K., RYU D. K., KIM S., RYU W. S. Insertion and deletion mutagenesis by overlap extension PCR. In: BRAMAN, J. (Ed.). **In vitro mutagenesis protocols**. 3rd. ed. Totowa: Humana Press, 2010. chap. 10, p. 137-146. (Methods in Molecular Biology, 634).

LEITE JUNIOR, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the state of Paraná, Brazil, **Crop Protection**, v. 9, n. 1, p. 3-7, 1990.

LI, J.; WANG, N. Genome-wide mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21804, 2011a.

LI, J.; WANG, N. The wxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 4, p. 381-396, 2011b.

LI, J.; WANG, N. Foliar Application of Biofilm Formation-Inhibiting Compounds Enhances Control of Citrus Canker Caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology**, v. 104, n. 2, p. 134-142, 2014.

LI, Y.; YAMAZAKI, A.; ZOU, L.; BIDDLE, E.; ZENG, Q.; WANG, Y.; LIN, H.; WANG, Q. I.; YANG, C. H. ClpXP protease regulates the type III secretion system of *Dickeya dadantii* 3937 and is essential for the bacterial virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 23, n. 7, p. 871-878, 2010.

LIFETIME Technology. **Real-time PCR handbook**. 66 p. Disponível em: <<http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

LIU, Y.; LARDI, M.; PEDRIOLI, A.; EBERL, L.; PESSI, G. NtrC-dependent control of exopolysaccharide synthesis and motility in *Burkholderia cenocepacia* H111. **PLoS one**, v. 12, n.6, p. e0180362, 2017.

LO, Y.Y.; SHANG-TIAN.; M; DAVID, B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 6, p. 689-694, 1997.

LOPES, J. M. S.; DÉO, T. F. G.; ANDRADE, B. M.; GIROTO, M.; FELIPE, A. L. S.; JUNIOR, C. E. I.; BUENO, C. E. M. S.; SILVA, T. F.; LIMA, F. C. C. Importância econômica do citros no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 20, n. 1, 2011.

LU, H.; YU, H.; GUO, R.; JIA, Y. Improvement of megaprimer method for site-directed mutagenesis and its application to phytase. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 3, n. 1, p. 43-46, 2009.

MACIEL, J. L. N.; DUARTE, V.; AYUB, M. A. Z. Plasmid DNA restriction profile and copper sensitivity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Rio Grande do Sul, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p.116-120, 1998.

MAIOROV, V. N.; CRIPPEN, G. M. Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, n. 2, p. 625-634, 1994.

MALAMUD, F.; TORRES, P. S.; ROESCHLIN, R.; RIGANO, L. A.; ENRIQUE, R.; BONOMI, H. R.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R.; VOJNOV, A. A. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, v. 157, p. 819-829, 2011.

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

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 604-622, 1995.

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. In: WU, R.; GROSSMAN, L.; MOLDAVE, K. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1983. v. 101, chap. 2, p. 20-78.

MOREIRA, L. M.; ALMEIRA JUNIOR, N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; DA SILVA, A. C. R.; SILVA, A. M. da; MORAES, F. E. de; OLIVEIRA, J. C. de; SOUZA, R. F. de; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE JUNIOR, R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; RODRIGUES NETO, J.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA JUNIOR, H. A.; STASKAWICZ, B. J.; TEZZA, R. I.; FERRO, J. A.; VINATZER, B. A.; SETUBAL, J. C. Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, New York, v. 11, n. 238, p. 1-25, 2010.

MORRIS, L.; CANNON, W.; CLAVERIE-MARTIN, F.; AUSTIN, S.; BUCK, M. DNA distortion and nucleation of local DNA unwinding within sigma-54 (sigma N) holoenzyme closed promoter complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 15, p. 11563-11571, 1994.

NASCIMENTO, J. F.; RODRIGUES NETO, J.; ALVES, J. M. A.; RÊGO, M. M. ARAÚJO, A. E. S. Ocorrência de cancro cítrico no estado de Roraima. **Summa Phytopathologica**, v. 29, p. 81-82, 2003.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010. 138 p. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/biblioteca/o_retrato_da_citricultura_brasileira_baixa.pdf>. Acesso em: 16 mai. 2017.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. **Anuário da citricultura 2017**: os desafios na cadeia produtiva do suco de laranja. São Paulo: CitrusBR, 2017. 57 p. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/revista/dezembro2017/revista_citrus_1217.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2018.

NIXON, B. T.; RONSON, C. W.; AUSUBEL, F. M. Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 83, n. 20, p. 7850-7854, 1986.

ORTET, P.; WHITWORTH, D. E.; SANTAELLA, C.; ACHOUAK, W.; BARAKAT, M. P2CS: updates of the prokaryotic two-component systems database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D536-D541, 2015.

PARISH, T. Two-component regulatory systems of mycobacteria. In: **Molecular Genetics of Mycobacteria**, Second Edition. American Society of Microbiology, 2014. p. 209-223.

PANDEY, A.; RAY, S. K.; SONTI, R. V.; RAJESHWARI, R. *gltB/D* mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are virulence deficient. **Current Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 105-112, 2014.

PANDEY, S. S.; PATNANA, P. K.; LOMADA, S. K.; TOMAR, A.; CHATTERJEE, S. Co-regulation of iron metabolism and virulence associated functions by iron and XibR, a novel iron binding transcription factor, in the plant pathogen *Xanthomonas*. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. e1006019, 2016.

PAZ-YEPES, J.; HERRERO, A.; FLORES, E. The NtcA-regulated amtB gene is necessary for full methylammonium uptake activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7791-7798, 2007.

QIAN, W.; HAN, Z.-J.; HE, C. Two-component signal transduction systems of *Xanthomonas* spp.: a lesson from genomics. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 21, n. 2, p. 151-161, 2008.

REITZER, L. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 155-176, 2003.

REZAEI, M.; SHAMS-BAKHS, M.; ALIZADEH, A. Genetic diversity among *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains in Iran. **Journal of plant protection research**, v. 52, n. 1, p. 1-9, 2012.

RICO, A.; JONES, R.; PRESTON, G. M. Adaptation to the plant apoplast by plant pathogenic bacteria. In: JACKSON, R. W. (Ed.). **Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology**. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. chap. 3, p. 63-89.

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

RODAS MENDOZA, E. F **Identificação de genes-alvos na patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com enfoque no sistema de secreção tipo III**. 2016. 151 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2016.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature Protocols**, v. 5, n. 4, p. 725-738, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. Plasmid vector. In: SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. (Ed.). **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v. 1, chap. 1, p. 1-110.

SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; JOHNSON, E.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. **Plant Pathology**, v. 64, n. 4, p. 767-775, 2015.
SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 2008.

SHIAU, S. P.; SCHNEIDER, B. L.; GU, W.; REITZER, L. J. Role of nitrogen regulator I (NtrC), the transcriptional activator of *glnA* in enteric bacteria, in reducing expression of *glnA* during nitrogen-limited growth. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 1, p. 179-185, 1992.

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.

SONG, X.; GUO, J.; MA, W. X.; JI, Z. Y.; ZOU, L. F.; CHEN, G. Y.; & ZOU, H. S. Identification of seven novel virulence genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by Tn5-based random mutagenesis. **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 330-336, 2015.

STALL, R. E.; CIVEROLO, E. L. Research relating to the recent outbreak of citrus canker in Florida. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 399-420, 1991.

STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. Canker, a threat to citrus in the Gulf-Coast states. **Plant Disease**, v. 67, n. 5, p. 581-585, 1983.

STUDHOLME, D. J.; DIXON, R. Domain architectures of σ^{54} -dependent transcriptional activators. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1757-1767, 2003.

SUN, X.; STALL, R. E.; JONES, J. B.; CUBERO, J.; GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; LACY, G. H. Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican lime and alemow in South Florida. **Plant Disease**, v. 88, n. 11, p. 1179-1188, 2004.

SUNNY, S.; GANDHI, M. P. I. An efficient citrus canker detection method based on contrast limited adaptive histogram equalization enhancement. **International Journal of Applied Engineering Research**, v. 13, n. 1, p. 809-815, 2018.

TIWARI, S.; JAMAL, S. B.; HASSAN, S. S.; CARVALHO, P. V.; ALMEIDA, S.; BARH, D.; AZEVEDO, V. Two-component signal transduction systems of pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1878, 2017.

URBAN, A.; NEUKIRCHEN, S.; JAEGER, K. E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 11, p. 2227-2228, 1997.

VOJNOV, A. A.; AMARAL, A. M. do; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A. P.; MARANO, M. R. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 467-477, 2010.

XIAO, Y. H.; YIN, M. H.; HOU, L.; LUO, M.; PEI, Y. Asymmetric overlap extension PCR method bypassing intermediate purification and the amplification of wild-type template in site-directed mutagenesis. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 6, p. 925-930, 2007.

YAMAMOTO, K.; HIRAO, K.; OSHIMA, T.; AIBA, H.; UTSUMI, R.; ISHIHAMA, A. Functional characterization *in vitro* of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 2, p. 1448-1456, 2005.

YAMAZAKI, A.; HIRATA, H.; TSUYUMU, S. HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, n. 2, p. 138-150, 2008.

YAN, Q.; WANG, N. The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 7, p. 1590-1599, 2011.

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

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

YARYURA, P. M.; CONFORTE, V. P.; MALAMUD, F.; ROESCHLIN, R.; PINO, V.; CASTAGNARO, A. P.; MCCARTHY, Y.; J. DOW, M.; MARANO, M. R. ;VOJNOV, A. A. XbmR, a new transcription factor involved in the regulation of chemotaxis, biofilm formation and virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4164-4176, 2015.

YOSHIMUCHI, T.; ZHANG, Y.; KIBA, A.; HIKICHI, Y.; OHNISHI, K. Expression of *hrpG* and activation of response regulator *HrpG* are controlled by distinct signal cascades in *Ralstonia solanacearum*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 75, p. 196–204, 2009.

ZHANG, Y.; CUMMINGS, A. D.; BURRIS, R. H.; LUDDEN, P. W.; ROBERTS, G. P. Effect of an *ntrBC* mutation on the posttranslational regulation of nitrogenase activity in *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 18, p. 5322-5326, 1995.

ZHANG, Y.; POHLMANN, E. L.; ROBERTS, G. P. GlnD is essential for *NifA* activation, *NtrB/NtrC*-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 4, p. 1254-1265, 2005.

ZIMARO, T.; THOMAS, L.; MARONDEDZE, C.; SGRO, G. G.; GAROFALO, C. G.; FICARRA, F. A.; GEHRING, C.; OTTADO, J.; GOTTIG, N. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 96-110, 2014.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 11, n. 11, p. 2291-2306, 2013.