

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ENVOLVIMENTO DO
OPERON *htrA*-XAC3983 NA PATOGENICIDADE E
VIRULÊNCIA DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* PATOTIPO
A**

Ana Carolina Buzinari da Silva

Bióloga

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ENVOLVIMENTO DO
OPERON *htrA*-XAC3983 NA PATOGENICIDADE E
VIRULÊNCIA DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* PATOTIPO
A**

Ana Carolina Buzinari da Silva

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientadora: Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho

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 Microbiologia
Agropecuária.

2019

Silva, Ana Carolina Buzinari da
S586c Caracterização funcional e envolvimento do operon *htra-xac3983* na patogenicidade e virulência de *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* patotipo A. Ana Carolina Buzinari da Silva. -- Jaboticabal, 2019
77p.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista(Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Jesus Aparecido Ferro
Coorientadora: Flávia Maria De Souza Carvalho

1. Microorganismos fitopatogênicos. 2. Biologia molecular.
3. Cancro (Fitopatologia). I. Título

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ENVOLVIMENTO DO OPERON *htrA*-XAC3983 NA PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* PATOTIPO A

AUTORA: ANA CAROLINA BUZINARI DA SILVA

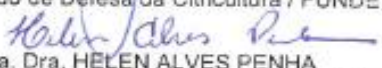
ORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

COORIENTADORA: FLAVIA MARIA DE SOUZA CARVALHO

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


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


Prof. Dr. FABRICIO JOSÉ JACIANI
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDE CITRUS - Araraquara/SP


Profa. Dra. HELEN ALVES PENHA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Prof. Dr. LEANDRO MARCIO MOREIRA
Departamento de Ciências Biológicas-ICEB/UFOP - Ouro Preto/MG


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

Jaboticabal, 30 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Ana Carolina Buzinari da Silva – nascida em 12 de janeiro de 1987, no município de Jaboticabal, São Paulo, filha de Wanderley Aparecido da Silva e Elisabete Buzinari da Silva. Formou-se em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA – Araraquara em 2011. Realizou iniciação científica como bolsista no Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, com início no ano de 2008 e término em novembro de 2010, onde atuou na área de biologia molecular de fitopatógenos e desenvolveu projeto de iniciação científica com o fitoplasma associado ao Huanglongbing dos citros. É mestre pelo programa de Microbiologia Agropecuária na Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal (FCAV), onde atuou na área de interação planta-patógeno e genômica comparativa, recebendo auxílio financeiro da CAPES. Em março de 2015 ingressou no curso de doutorado pelo programa de Microbiologia Agropecuária, nessa mesma universidade, sob orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e coorientação da Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho.

Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós
É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito, é saber sonhar
Então fazer valer a pena
Cada verso daquele poema sobre acreditar
Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações
A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe pra perto de mim
Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar
E sim sobre cada momento, sorriso a se compartilhar
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera a vida já ficou pra trás
Segura teu filho no colo
Sorria e abraça os teus pais enquanto estão aqui
Que a vida é trem-bala, parceiro
E a gente é só passageiro prestes a partir

Ana Vilela

"There is nothing like a dream to create the future"
Victor Hugo

À minha mãe **Elisabete** (*in memoriam*) e à minha avó, **Aparecida**, meus maiores exemplos de amor incondicional e do que é ser uma mulher forte diante da vida.

Ao meu pai **Wanderley**, ao meu marido **Leandro**, aos meus irmãos, **Ricardo e Kamila**, e ao meu sobrinho **Rafael**. Se cheguei até aqui, não tenho dúvidas que foi porque contei com o amor de vocês sempre presente em minha vida.

Amo vocês!!!

Dedico com amor

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu eterno pai, por nunca me desamparar e por me permitir crescer, evoluir e me superar ao final dessa etapa tão importante da minha vida. Foi sempre em ti que encontrei respostas e ânimo para continuar, mesmo diante das maiores dificuldades.

Aos meus pais, Elisabete e Wanderley, minha eterna gratidão a vida que me deram, por apoiarem minhas escolhas, me incentivarem e por me criarem para o mundo, sempre me ensinando a ser independente e forte. A vocês todo o meu amor, respeito e gratidão, sempre!

Ao meu companheiro de vida, meu marido Leandro, por ter andado ao meu lado em toda essa caminhada. Todo o seu amor, apoio e incentivo nos momentos em que eu já não tinha mais paciência ou ânimo me acalmaram e me encorajaram a acreditar que eu conseguiria. Agradeço a Deus pelo nosso crescimento e evolução durante todo esse processo. Muito obrigada, meu bem.

Aos meus irmãos, Ricardo e Kamila, e minha cunhada, Laura, pelo amor sempre presente em minha vida, de longe ou de perto, mas sempre me apoiando e vibrando pelas minhas vitórias.

Ao meu sobrinho Rafael, por me ensinar tanto mesmo sendo ainda tão pequeno. Seu amor puro e gratuito sempre me serviu de combustível e trouxe paz e alegria à minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro pelos ensinamentos, aprendizados e pelo tempo a mim dispensado. Aprendi muito com o senhor.

À Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho, agradeço por ser muito mais do que uma coorientadora, mas também uma grande amiga. Foi um prazer aprender tantas coisas com você, sempre tão generosa e paciente. Obrigada pelos puxões de orelha nos momentos necessários e pelos conselhos e ensinamentos. Que você continue sendo luz por onde passa “Flávia Mamis”, e que Deus sempre te abençoe.

À prof. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro por todo o auxílio, ensinamentos e por não medir esforços para me ajudar sempre que foi necessário. Serei sempre grata por todo o apoio e pelo excelente convívio com a senhora.

À Julie Anne Espíndola Amorim, pela amizade fiel e muito além do ambiente de trabalho, pela companhia nos bons e maus momentos e por tantas experiências divididas. Sua amizade me ensinou muito, minha amiga querida. Eu desejo que você sempre receba de volta todo esse amor e ternura que você transmite!

Às amigas que tanto me apoiaram e que a amizade fortaleci durante esse período: Catarina, Tamiris, Michelle, Jessica, Flavinha, Claudênia, Danielle, Helen, Juliana Vantini e Amanda. As nossas risadas e cafés fizeram os meus dias no laboratório muito mais felizes!!!

Aos amigos Luís Teheran e Bruno Weiss, pelas discussões e conselhos sempre muito pertinentes sobre o meu trabalho e pela amizade que construí com cada um. A convivência com vocês sempre alegrou os meus dias.

Aos amigos do LBM pelo ótimo convívio, pelos momentos de descontração, pelo companheirismo de todos e pelo auxílio com os experimentos quando foi necessário. Aos ex membros: Fernando, Claudênia, Aline Lopes, Aline Belesine, Bruna, Juan, Sônia, Flavinha e Danilo. Aos que ficam: Amanda, Luís, Bruno, Rafael, Heloisa, Daniela, Iashilei, Luana, Felipe, Wallynson e Francini.

À equipe do Crebio: Agda, Mariza, Danielle e Célia, agradeço pelos serviços prestados, pela amizade e pela excelente convivência com cada uma.

Aos colegas do laboratório de mitocôndria e do laboratório de proteômica pela agradável convivência: Ana Paula, Giovana, André, Amanda, Gabriel e Patrícia. Em especial à Marina Chioda, que se tornou uma grande amiga.

À Natasha Fonseca, uma amizade especial que ganhei no final do doutorado, dividindo várias noites de trabalho regadas a café, comida e boas conversas.

À amiga Maria Ângela Coelho Silva, por todo o apoio e amizade não só ao longo dessa jornada, mas já há vários anos.

A todos os meus familiares e em especial às minhas tias Arlete e Ivete e à minha avó Aparecida, pois mesmo à distância sempre se fizeram presentes, torceram por mim e me deram todo o apoio e carinho para que essa jornada se tornasse “mais leve”.

Aos meus sogros, Sônia e Roberto, e aos meus cunhados, Juliana e Roberto, pelo apoio, carinho e incentivo durante tantos momentos. Obrigada por verdadeiramente me acolherem como família e sempre fazerem de tudo para me ajudar.

Ao meu companheiro durante todos os momentos de escrita dessa tese, meu querido cãozinho, Flash, que me fez companhia com seus roncos, carinhos, e me fez sentir tanto amor e paz mesmo nos momentos de maior ansiedade.

A todos os meus amigos pelo apoio, carinho e torcida durante esse processo. Tenho muita sorte em tê-los em minha vida.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária pelo conhecimento transmitido durante as disciplinas, fóruns e palestras ao longo do doutorado.

À equipe da seção técnica de pós-graduação: Branca, Diego e Márcia, todos sempre prontamente dispostos a ajudar e solucionar minhas dúvidas.

A cada um que contribuiu direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado, deixo aqui o meu sincero agradecimento.

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

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão Interna de Biossegurança.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A citricultura e o cancro cítrico.....	3
2.2 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	4
2.3 Genômica funcional	6
2.4 Operons e a transcrição gênica	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Estirpes bacterianas, plasmídeos e meios de cultura utilizados.....	11
3.2 Obtenção do operon constituído pelos genes <i>htrA</i> (XAC3980) a XAC3983	12
3.2.1 Inoculação de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> em folhas de citros e exsudação	12
3.2.2 Extração de RNA total	13
3.2.3 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores dos operons XAC3981-3983 e XAC3980-3983.....	13
3.2.4 Síntese de cDNA e RT-PCR	14
3.3 Mutagênese sítio-dirigida por PCR para obtenção dos mutantes	15
3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores	15
3.3.2 Reação de PCR para a obtenção dos fragmentos AB, CD e AD	21
3.3.3 Reação de digestão com endonucleases de restrição dos fragmentos AD-XAC3982, AD-RIP3980/81, AD-RIT3980/81 e AD-RIT3979/80	22
3.3.4 Clonagem em vetor pNPTS138 e transformação em células de <i>E. coli</i> DH10B quimicamente competente.....	23
3.3.5 Transformação em células eletrocompetentes de Xac 306.....	24
3.3.6 Seleção e confirmação dos mutantes.....	25
3.3.7 Confirmação da identidade da Xac 306 mutada	26
3.4 Testes de patogenicidade	27
3.4.1 Testes de patogenicidade por infiltração, perfuração e pulverização para os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81	27

3.4.2 Teste de patogenicidade por infiltração para os mutantes Δ RIT3980/81 e Δ RIT3979/80	28
3.5 Experimentos realizados para os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81	28
3.5.1 Inoculação em planta não hospedeira	28
3.5.2 Curva de crescimento bacteriano <i>in planta</i>	29
3.5.3 Ensaio de formação de biofilme em meios de cultura NB e XVM2	29
3.5.4 Extração e quantificação de goma xantana	30
3.5.5 Motilidade bacteriana	31
3.5.6 Diagnóstico, inoculação e reisolamento bacteriano	31
3.6 Análises <i>in silico</i>	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Mutagênese sítio-dirigida por PCR para obtenção dos mutantes Δ XAC3982, Δ RIP3980/81, Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81	33
4.2 O gene <i>htrA</i> é transcrito em um único RNA mensageiro juntamente com os genes XAC3981, XAC3982 e XAC3983	35
4.3 As mutações das regiões intergênicas a montante dos operons XAC3981-3983 e <i>htrA</i> -XAC3983 são apolares	47
4.4 Teste de patogenicidade para os mutantes Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81 ...	49
4.5 Experimentos realizados com os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81	51
4.5.1 Teste de patogenicidade em laranja doce ‘Hamlin’ (<i>Citrus sinensis</i> Osbek), tangerina ‘Ponkan’ (<i>Citrus reticulata</i>) e Citrumelo ‘Swingle’ (<i>Citrus paradisi</i> Macf. x <i>Poncirus trifoliata</i> L. Raf.)	51
4.5.2 Curva de crescimento bacteriano <i>in planta</i>	56
4.5.3 Reação de Hipersensibilidade em pimenta	56
4.5.4 Formação de biofilme em meio de cultura NB e XVM2 e produção de goma xantana	58
4.6 Análise das motilidades “swimming” e “swarming”	61
4.7 Análises <i>in silico</i> da proteína hipotética XAC3982	62
5 Considerações finais	64
6 REFERÊNCIAS	65
Apêndice A. Sequenciamento do operon XAC3980-3983	74
Apêndice B. Blastn dos oligonucleotídeos utilizados para a mutação sítio dirigida por PCR	76

CIBIO

A Comissão Interna de Biossegurança aprovou o desenvolvimento do projeto intitulado “CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ENVOLVIMENTO DO OPERON *htrA*-XAC3983 NA PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* PATOTIPO A”.

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E ENVOLVIMENTO DO OPERON *htrA*-XAC3983 NA PATOGENICIDADE E VIRULÊNCIA DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* PATOTIPO A

Resumo – O cancro cítrico tem como agente causal a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), que afeta todas as espécies de citros economicamente importantes. O sequenciamento do genoma do isolado 306 desta bactéria (Xac 306) revelou que 37,4 % dos genes não tinham uma função predita. Assim, a genômica funcional da interação Xac-hospedeiro tem um papel importante na elucidação da função dos genes e dos mecanismos envolvidos na patogenicidade e virulência dessa bactéria. Os genes XAC3981, XAC3982 e XAC3983 fazem parte deste contexto de genes codificadores de proteínas sem função conhecida (hipotéticas). As proteínas codificadas por estes três genes são conservadas em bactérias da família Xanthomonadaceae. Em um estudo prévio, o gene XAC3981 da Xac 306 foi interrompido por inserção do transposon Tn5 e esse mutante apresentou ausência de sintomas quando inoculado em plantas cítricas, sugerindo que possui um papel importante na patogenicidade de Xac. No presente estudo demonstrou-se que os genes XAC3981-3983, juntamente com o gene *htrA* (XAC3980), constituem um operon funcional de Xac 306. O presente estudo avaliou também os efeitos de mutações por deleção em algumas regiões do operon *htrA*-3983. Um mutante foi produzido por deleção de 84% da sequência codificadora do gene XAC3982 (Δ XAC3982) e outros três foram obtidos pela deleção das regiões promotoras desse operon. O mutante Δ XAC3982, quando comparado com a estirpe selvagem, alterou o fenótipo em genótipos resistentes e suscetíveis de citros e produziu menos biofilme *in vitro*. Observou-se que os promotores preditos, quando analisados isoladamente, não tem efeito sobre a virulência total dessa bactéria e não interferem na transcrição deste operon. Os resultados obtidos sugerem que o operon, denominado neste estudo como operon *htrA*-XAC3983, está relacionado com a virulência e patogenicidade de Xac.

Palavras-chave: cancro cítrico; interação planta-patógeno; mutagênese sítio dirigida; operon; proteínas hipotéticas.

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION AND INVOLVEMENT OF OPERON *htrA*-XAC3983 IN PATHOGENICITY AND VIRULENCE OF *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* PATHOTYPE A

Abstract - The bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) is the causal agent of citrus canker, a disease that affects all economically important citrus species. The genome sequencing of the 306 isolate of this bacterium (Xac 306) revealed that 37.4% of the genes had no predicted function. Thus, the functional genomics of the Xac-host interaction play an important role in the elucidation of the function of the genes and in the mechanisms involved in the pathogenicity and virulence of this bacterium. The genes XAC3981, XAC3982 and XAC3983 are part of this context of protein coding genes with unknown function (hypothetical). The proteins encoded by these three genes are conserved and present exclusively in bacteria of the family Xanthomonadaceae. In a previous study, the ORF XAC3981 from Xac306 was disrupted by insertion of the Tn5 transposon and the mutant showed no symptoms when inoculated in citrus plants, suggesting that it plays an important role in Xac pathogenicity. In the present study, genes XAC3981-3983, together with gene *htrA* (XAC3980), have been shown to constitute a functional operon of Xac 306. The present study also evaluated the effects of deletion mutations in some regions of XAC3980-3983 operon. One mutant was produced by deleting 84% of the coding sequence of the gene XAC3982(Δ XAC3982) and another three were obtained by deleting the promoter regions of that operon. The Δ XAC3982 mutant, when compared to the wild type strain, altered the phenotype in resistant citrus genotypes and produced less biofilm *in vitro*. It has been observed that the predicted promoters, when analyzed alone, have no effect on the total virulence of this bacterium and do not interfere in the transcription of this operon. The results presented here suggest that the operon, termed as operon *htrA*-XAC3983 in this study, is related to the virulence and pathogenicity of Xac.

Keywords: citrus canker; plant-pathogen interaction; site-directed mutagenesis; operon; hypothetical protein.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é o agente causal do cancro cítrico e afeta todas as variedades comerciais de citros (Vauterin et al., 1995) e um controle efetivo para essa doença é inexistente até o momento. Entretanto, com a disponibilização do genoma do isolado 306 (Xac 306) deste fitopatógeno (Da Silva et al., 2002), inúmeras informações a respeito desse micro-organismo ficaram disponíveis a nível molecular, possibilitando o início de estudos de funcionalidade dos genes desse fitopatógeno (Laia et al., 2009; Martins et al., 2010). Quando da anotação do genoma em 2002, um total de 4.428 ORFs (“Open Reading Frame”) (genes) foram encontradas, sendo que para 37,4% delas não havia nenhuma função predita, ou seja, codificavam proteínas sem função conhecida, daí o nome de hipotéticas. Desde então este número foi muito pouco alterado pois, mesmo diante de todas as abordagens de genômica funcional disponíveis, a maioria dos genes anotados como codificando proteínas com função desconhecida (hipotéticas) ainda não foram avaliados experimentalmente. Sendo assim, se faz necessário avaliar e caracterizar os genes que codificam proteínas hipotéticas em Xac para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na patogenicidade e virulência dessa bactéria.

Com esse intuito, nosso grupo de pesquisa vem utilizando técnicas de mutagenese e de análise da expressão global de genes (RNA-seq) a fim de entender os mecanismos pelos quais a Xac consegue infectar, se multiplicar e se manter no apoplasto da planta e desencadear cancro. O primeiro passo nesse caminho se deu com a produção e análise *in planta* de uma biblioteca de mutantes de Xac, por meio de inserção aleatória *in vivo* de transposon (Tn5), o que possibilitou a identificação de diversos genes implicados no processo de patogênese e virulência neste fitopatógeno (Laia et al., 2009, Ferreira et al., 2017).

Um desses mutantes de Xac produzidos por Laia e colaboradores (2009) interrompeu o gene XAC3981, o qual codifica uma proteína hipotética. Moreira e colaboradores (2017), utilizando a abordagem proteômica, avaliaram a expressão dessa proteína hipotética em condições infectantes e observaram que sua expressão foi regulada positivamente (“up-regulated”) nesta condição. Além disso, os testes de patogenicidade demonstraram que o mutante Δ XAC3981 apresentou

sintomas atenuados do cancro cítrico em folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) e limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), o que sugere que este gene tenha um papel relevante na virulência da bactéria (Moreira et al., 2017).

Os genes XAC3982 e XAC3983, que também codificam proteínas hipotéticas, estão a jusante do gene XAC3981 e, segundo as ferramentas ProOpDB (Taboada et al., 2011) e DOOR (Mao et al., 2014), são preditos de serem transcritos em um único RNA mensageiro policistrônico. A interpretação de Moreira et al. (2017) foi a de que a inserção do transposon Tn5 no gene XAC3981 provavelmente interrompe a expressão de XAC3982 e XAC3983, uma vez que esses genes estão previstos como fazendo parte de um operon. Entretanto, pesquisas com o uso de outra ferramenta para a busca de operons, a “Microbes Online Operon Predictions” (Dehal et al., 2009), indicou que o referido operon seria composto por esses três genes juntamente com o gene *htrA* (XAC3980), que codifica uma proteína pertencente à família das proteases HtrA “High Temperature Requirement A”.

Diante dessa nova hipótese, de que o operon seria constituído por 4 genes e não apenas 3, e dos resultados obtidos com o mutante Δ XAC3981 por Moreira e colaboradores (2017), no presente estudo investigou-se se o operon *htrA*-XAC3983 é expresso como um transcrito único e se desempenha um papel importante no processo infeccioso da Xac 306 em genótipos suscetíveis (*Citrus sinensis* Osbeck e *Citrus paradisi*) e resistente (*Citrus reticulata*) ao cancro cítrico e se os preditos promotores desse operon regulam a expressão do mesmo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A citricultura e o cancro cítrico

A citricultura é um dos mais tradicionais setores do agronegócio brasileiro e o Brasil responde por 34% da produção de laranja (Neves e Trombim, 2017) e por mais de 3/4 das exportações globais de suco de laranja, segundo o levantamento feito pelo Departamento da Agricultura dos Estados Unidos, o qual destaca o país como o mais importante fornecedor global desse nobre produto (USDA, 2019). A maior região produtora de laranjas no Brasil é denominada como cinturão citrícola e engloba o estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, e é responsável por mais de 80% da produção (Neves et al., 2010).

Atualmente a citricultura vive um momento de fortes transformações em sua cadeia produtiva. Muitos são os desafios enfrentados por esse setor devido ao aumento da incidência de doenças no campo, onde entre as doenças de maior impacto econômico e importância aos citricultores estão o Huanglongbing (HLB ou greening) e o cancro cítrico (FERENCE et al., 2017).

Em levantamento realizado em 2018 pelo Fundo de Defesa da Citricultura – Fundecitrus, foi revelado que o cancro cítrico está presente em 16,43% dos talhões no parque citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro (Fundecitrus, 2018).

Entre os impactos econômicos decorrentes do cancro cítrico estão a depreciação dos frutos pela presença de lesões, que os tornam inaceitáveis para o mercado de frutas frescas, a redução na produção pela queda prematura de frutos sintomáticos e a restrição da comercialização para áreas livres da doença (Fundecitrus, 2018). Para a indústria produtora de suco de laranja o cancro cítrico não afeta diretamente a qualidade do suco, sendo que o maior potencial de impacto da doença nos pomares é na redução da produção decorrente da queda prematura dos frutos (Fundecitrus, 2018).

O controle do cancro cítrico era baseado principalmente na inspeção de pomares e na exclusão de plantas doentes (Belasque Junior et al., 2005). Nos últimos anos passou a focar na adoção de medidas integradas de manejo, visando

a minimização do impacto provocado pela doença no campo e na produção dos frutos (Behlau, Sala, Bassanezi, 2017; Amorim, 2018).

A partir de 2017 entrou em vigor no estado de São Paulo a nova legislação determinada pela Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento nº. 10 de 20/02/2017 (Resolução SAA 10), a qual estabelece como medida de controle o Sistema de Mitigação de Risco (SMR). A mitigação de risco permite ao citricultor manter as plantas com sintomas de cancro cítrico em seus pomares (Behlau, Sala, Bassanezi, 2017). Com a adoção do SMR a incidência da doença nos pomares em 2018 foi 35% maior em relação ao ano anterior no parque citrícola de São Paulo e Triângulo e Sudoeste Mineiro (Fundecitrus, 2019).

O cancro cítrico tem sua instalação nos citros preferencialmente em folhas de brotações novas e em frutos nas primeiras fases de crescimento (Amaral, 2003).

A doença é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad et al., 2006) e a severidade das infecções causadas por esse fitopatógeno variam conforme as espécies, variedades, condições climáticas predominantes e as medidas de controle adotadas (Das, 2003).

2.2 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

O gênero *Xanthomonas* contém uma ampla variedade de espécies, linhagens e hospedeiros. Representa o maior grupo de bactérias fitopatogênicas de importância econômica (Vauterin et al., 2000; Vicente et al., 2001).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Schaad et al., 2006) foi anteriormente classificada como *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (Xac) (Vauterin et al., 1995) e, devido a essa nomenclatura, alguns trabalhos ainda usam a abreviação Xac para nomeá-la, assim como foi usada no presente trabalho. A Xac é o agente causal do cancro cítrico, também conhecido como cancro cítrico asiático ou cancrose A, forma mais agressiva e propagada da doença e que afeta todas as variedades comerciais de citros (Das, 2003).

Além da estirpe A de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, outras duas variantes foram identificadas e denominadas A* (Vernière et al., 1998) e A^w (Sun et al., 2004). Ambas possuem limitada gama de hospedeiros e são consideradas menos severas

quando comparadas com a estirpe A. Apesar de produzirem sintomas típicos de cancro cítrico e serem geneticamente similares a Xac, a patogenicidade destas duas variantes é restrita e semelhante à *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolli* tipos B e tipo C, causadoras da cancriose dos citros (Verniere et al., 1998).

A Xac é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica obrigatória, tem formato de bastonete e possui um único flagelo polar. Sua temperatura ótima de crescimento varia entre 28°C e 30°C e, em meio de cultura, produz coloração amarela devido a produção do pigmento xantomonadina (Brunings e Gabriel, 2003; Das, 2003).

A penetração da Xac nos tecidos vegetais de citros ocorre através de aberturas naturais como os estômatos, hidatódios e lenticelas (Gottwald e Graham, 1992; Graham et al., 1992), por ferimentos mecânicos e por galerias formadas pela larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) (Das, 2003).

A bactéria coloniza o espaço apoplástico de folhas, frutas e caules jovens causando sintomas de infecção como lesões necróticas circulares e eruptivas, muitas vezes com um halo clorótico amarelo em folhas e frutos, resultado da multiplicação da bactéria e encharcamento do tecido vegetal do hospedeiro (Brunings e Gabriel, 2003; Belasque Junior et al., 2005).

As bactérias fitopatogênicas devem ser capazes de aderir à superfície da planta, invadir o espaço intracelular do tecido hospedeiro, adquirir nutrientes e neutralizar as respostas de defesa para uma infecção bem-sucedida (Buttner e Bonas, 2010). Para se desenvolver nos espaços intracelulares, as *Xanthomonas* têm que coordenar o processo de multiplicação e produzir polissacarídeos extracelulares, principalmente a goma xantana (Padmanabham et al., 1973 apud Jaciani, 2012). O acúmulo de goma xantana e a diminuição do espaço intracelular proporciona o aspecto de encharcamento no tecido infectado, ocorrendo o aprisionamento da água do xilema devido ao potencial higroscópico da goma (Graham et al., 2004, Padmanabham et al., 1973 apud Jaciani, 2012).

Os sintomas iniciais do cancro podem ser observados nas folhas aproximadamente nove dias após a infecção e, com o passar do tempo, as pústulas que se formam vão se tornando de coloração marrom escura (Gottwald, Graham, Schubert, 2002; Graham et al., 2004). Os sintomas mais evidentes são decorrentes de hiperplasia e hipertrofia, desencadeadas pelo patógeno ao alterar a transcrição de alguns genes do hospedeiro (Cernadas et al., 2008).

A proteínas que são translocadas para o interior da célula hospedeira são designadas proteínas efetoras. A proteína efetora PthA, uma proteína de virulência pertencente à família AvrBs3/PthA, é utilizada para modular a transcrição do hospedeiro e desencadear o cancro cítrico pela Xac (Domingues et al., 2010). Além disso, esse fitopatógeno apresenta um extenso arsenal de 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., 2013).

2.3 Genômica funcional

A genômica é um ramo que estuda a caracterização da estrutura comparativa, função, evolução e mapeamento de genomas (Nelson e Cox, 2014). Um genoma é composto pela sequência completa do DNA de um organismo (Alberts et al., 1999). A genômica pode ser dividida em três diferentes vertentes: genômica estrutural, funcional e comparativa (Amaral, 2006).

A genômica estrutural visa compreender a estrutura e organização dos genes. Já as análises de genômica comparativa buscam conhecer as relações entre os genomas e a homologia entre sequências e genes, determinando o grau de sintenia (a ordem gênica conservada) de espécies correlacionadas (Amaral, 2006; Nelson e Cox, 2014). A genômica funcional auxilia na determinação da função e do processo celular onde os genes atuam (Nelson e Cox, 2014).

O sequenciamento completo do genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 possibilitou caracterizar a estrutura desse micro-organismo em um cromossomo circular e dois plasmídeos, denominados pXAC33 e pXAC64. Foram identificadas 4.313 ORFs, sendo possível associar uma função biológica para 62,83% delas (Da Silva et al., 2002).

A disponibilidade do genoma da Xac possibilitou um grande avanço na pesquisa e no desenvolvimento de estudos a respeito desse fitopatógeno. Entretanto, muitos genes ainda não têm evidências experimentais que lhes

atribuam uma função (Amaral, 2006). Diante desse cenário, estudos a respeito da genômica funcional de *Xac* são estritamente necessários, visando atribuir funções aos genes e proteínas ainda caracterizados como hipotéticos, assim como buscar novos genes alvos e auxiliar a compreensão dos mecanismos moleculares utilizados por esse patógeno para os infectar os citros e causar a doença (Amaral, 2006; Amorim, 2018).

Quando a clonagem gênica ainda não era utilizada, a maioria dos genes eram identificados pela associação da alteração de um dado fenótipo a um gene mutado. Uma das técnicas de obtenção desses mutantes era a mutação randômica, a partir do uso de elementos genéticos de transposição aleatórios, os transposons (Alberts et al., 2002).

Uma biblioteca de mutantes de *Xac* foi gerada por meio de inserção aleatória *in vivo* do transposon Tn5 no genoma (Laia et al., 2009). Entretanto, encontrar mutantes específicos em uma biblioteca desse tipo pode ser um trabalho difícil se o fenótipo que o gene de interesse afeta não for tão evidente. Sendo assim, uma outra estratégia é a mutação em um gene específico, por deleção parcial ou total por recombinação homóloga, para estudar seu efeito sobre o fenótipo (Souza, 2002).

Uma maneira de obter mutantes em regiões específicas do genoma é por mutação sítio-dirigida por PCR “Polymerase Chain Reaction”. Essa técnica permite, de forma eficiente, a mutação de genes bacterianos por meio da troca, por recombinação homóloga, da cópia selvagem do gene alvo por uma cópia truncada ou que contenha alguma deleção (Lee et al., 2009).

A produção de mutantes por inserção aleatória do transposon Tn5 se mostrou eficiente em diversos trabalhos com bactérias patogênicas (Jacobs et al., 2003; Guo et al., 2010; Luan et al., 2017). Em *Xac*, estudos a partir da análise de mutantes produzidos por inserção aleatória, quando analisados *in planta*, identificaram diversos genes envolvidos no processo de patogênese e virulência (Laia et al., 2009; Ferreira, 2009; Yan e Wang, 2012). Dentre esses mutantes, um deles demonstrou ausência de sintoma quando inoculado em folhas de limão cravo, e se refere ao gene *htrA* “high temperature requirement A” (XAC3980), o qual codifica uma serino protease HtrA, também conhecida como DegP (Laia et al., 2009). A família HtrA de chaperonas e serino proteases é importante por

regular respostas de estresse e controlar a qualidade da proteína no periplasma de bactérias (Backert et al., 2018).

As proteínas Htra estão associadas a doenças infecciosas, uma vez que a inativação dos genes *htrA* resultam em propriedades de virulência significativamente reduzidas por vários patógenos bacterianos (Backert et al., 2018). Em Xac, esse gene é predito como pertencente a um operon, juntamente com outros três genes, XAC3981, XAC3982 e XAC3983 (Microbes online - Dehal et al., 2009), sendo que esses três genes codificam proteínas classificadas como hipotéticas conservadas (Moreira et al., 2017), uma vez que também estão presentes em várias outras espécies de *Xanthomonas* e mesmo em outras bactérias, mas não se conhece as suas funções.

As proteínas e genes hipotéticos, sem funções definidas, são amplamente distribuídos em todos os genomas bacterianos sequenciados. Entender suas funcionalidades é uma exigência básica para os bacteriologistas (Wang et al., 2017) assim como um desafio, visto que nenhuma informação de referência está disponível. Da mesma forma, o estudo de genes que são agrupados em operons pode contribuir para um melhor entendimento sobre a função e regulação gênica (Ermolaeva et al., 2001).

2.4 Operons e a transcrição gênica

Alguns genes em genomas bacterianos são organizados em operons, sendo co-transcritos em uma única molécula de RNA mensageiro (RNAm). Os operons são agrupamento de genes estruturais localizados em sequência no cromossomo (Nelson e Cox, 2014). Nas bactérias um conjunto de genes adjacentes é frequentemente transcrito em um RNAm único que, portanto, carregará a informação de diversas proteínas (Alberts et al., 1999). Quando esse RNAm possui múltiplos genes em um único transcrito bacteriano ele é denominado policistrônico (Nelson e Cox, 2014).

O primeiro passo na expressão de um gene é a transcrição, que ocorre quando há a transferência de informações do DNA de um gene, ou grupo de genes, para o RNA (Ramalho et al., 2012). A enzima RNA polimerase é a responsável por regular essa transferência (Drennan et al. 2012).

Em bactérias, a RNA polimerase se liga ao DNA para iniciar a transcrição ao encontrar uma região denominada promotora, que fica a montante do sítio de início da transcrição e possui uma sequência de nucleotídeos que sinaliza o ponto de início para a síntese de RNA (Alberts et al., 1999).

A região promotora é composta por um promotor e um operador (Ermolaeva et al., 2001; Ramalho et al., 2012). O promotor sinaliza o início da síntese do RNAm pela RNA polimerase e o operador, um segmento curto de DNA localizado entre o promotor e os genes estruturais, é o local onde uma proteína repressora se liga para impedir a transcrição (Alberts et al., 1999; Ramalho et al., 2012).

O primeiro modelo de operons que elucidou a regulação da expressão gênica foi proposto pelos pesquisadores franceses François Jacob e Jacques Monod em 1961. Nesse artigo clássico eles descreveram o mecanismo regulador do operon da lactose (lac) de *Escherichia coli* (*E. coli*), que explicou a base bioquímica da utilização da lactose pela bactéria (Ramalho et al., 2012), um sistema que permite à bactéria reprimir a produção de enzimas envolvidas no metabolismo da lactose quando essa não está disponível (Berg et al., 2002).

Para o operon de lactose (lac), o gene *i* codifica o repressor, *o* é o local do operador, e os genes *z*, *y* e *a* são os genes estruturais da β -galactosidase, da permease e da transacetilase, respectivamente (Berg et al., 2002), como pode ser observado na Figura 1.



Figura 1. Sequência do operon lac em *E. coli* descrito por Jacob e Monod em 1961. Na primeira região da figura se observa um gene repressor que antecede esse operon e está identificado pelo número um. O operon lac compreende a região reguladora, composta por um promotor e um operador, identificados como P e O respectivamente, e pelos genes estruturais lacZ, lacY e lacA, localizados em sequência no genoma da *E. coli*. Fonte: Ruberti, 2013.

Os promotores controlam a transcrição de todos os genes, e para os procariotos existe um determinado promotor para um conjunto de genes, sendo

que os RNAs que são transcritos possuem informações variadas de produtos gênicos, que na maioria dos casos estão relacionados metabolicamente (Li et al., 2015; Moreira, 2016). Entretanto, embora cada conjunto de genes possua um promotor, nem todos são idênticos entre si, pois nas células bacterianas a RNA polimerase é confrontada com um conjunto com cerca de pelo menos 2.000 sequências promotoras diferentes (Browning e Busby, 2004).

Em *E. coli* existem duas regiões promotoras já bem estabelecidas que são formadas pelos hexâmeros TTGACA localizada a 35 pb a montante do início da transcrição (sequência consenso -35) e TATAAT localizada a 10 pb a montante do início da transcrição (consenso -10). Geralmente elas são separadas entre si por 17 pares de bases e a transcrição é iniciada sete pares de bases após a região -10 (Moreira, 2016).

Os operons são um modo comum de organização de genes em algumas bactérias (Liu et al., 2009), e alguns já são descritos com interações em processos biológicos como copAB que é responsivo ao cobre (Teixeira et al., 2008), o operon gum que compreende os genes cujos produtos estão envolvidos na biossíntese do polissacarídeo extracelular xantana em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Vojnov et al., 2001), e operons que conferem resistência a mercúrio (Helmann et al., 1989).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estirpes bacterianas, plasmídeos e meios de cultura utilizados

As estirpes bacterianas e os plasmídeos utilizados no presente estudo estão listados na Tabela 1. Os meios de cultura utilizados para os experimentos foram: meio “Nutrient Agar” (NA) (extrato de carne 3g/L, peptona 5 g/L e ágar 15g/L) e meio “Nutrient Broth” (NB) (extrato de carne 3g/L, peptona 5 g/L) para o cultivo da *Xanthomonas*; Meio Goma (25 g/L de glicose, 3 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de K_2HPO_4 , 0,1 g/L de $MgSO_4 \times 7.H_2O$, pH 7,0) para o ensaio de extração e quantificação de goma xantana; meio XVM2 (20 mM de 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 sacarose e 0,03% de casaminoácidos, pH 6.7) para a formação de biofilme e meio “Nutrient Broth Yeast extract (NBY) (3 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 2 g/L de K_2HPO_4 , 0,5 g/L de KH_2PO_4 , pH 7,2) para a transformação de Xac eletrocompetente.

A estirpe de *Escherichia coli* DH10B utilizada para transformação do plasmídeo foi cultivada em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de cloreto de sódio, pH 7,0) a 37°C por 16 horas. Quando necessário, os meios de crescimento foram suplementados com o antibiótico canamicina na concentração de 30 µg/mL.

Para a curva de crescimento bacteriano as suspensões foram diluídas em tampão fosfato 1X (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 , 0,24 g/L de KH_2PO_4 , pH 7,3).

Tabela 1 - Estirpes bacterianas e plasmídeos utilizados no presente estudo.

Estirpe e plasmídeos	Característica	Referência
Xac 306	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> , estirpe 306 Rif ^r	(Da Silva et al., 2002)
ΔXAC3982	Mutante por deleção do gene XAC3982 derivado da cepa Xac 306	Presente estudo
ΔRIP3980/81	Mutante por deleção parcial da região intergênica entre os genes <i>htrA</i> (XAC3980) e XAC3981 derivado da cepa Xac 306	Presente estudo
ΔRIT3980/81	Mutante por deleção total da região intergênica entre os genes <i>htrA</i> (XAC3980) e XAC3981 derivado da cepa Xac 306	Presente estudo
ΔRIT3979/80	Mutante por deleção total da região intergênica entre os genes XAC3979 e <i>htrA</i> (XAC3980) derivado da cepa Xac 306	Presente estudo
<i>E.coli</i> DH10B	Δ(<i>mcrA</i> , <i>mcrBC</i> , <i>mrr</i> , A1 e <i>hsdRMS</i>), <i>pir</i> ⁺ , <i>lacZ</i>	Invitrogen
pNPTS138	Vetor suicida, Km ^r	Addgene
pNPTS138-ΔXAC3982	pNPTS138 contendo a construção ΔXAC3982	Presente estudo
pNPTS138-ΔRIP3980/81	pNPTS138 contendo a construção ΔRIP3980/81	Presente estudo
pNPTS138-ΔRIT3980/81	pNPTS138 contendo a construção ΔRIT3980/81	Presente estudo
pNPTS138-ΔRIT3979/80	pNPTS138 contendo a construção ΔRIT3979/80	Presente estudo

3.2 Obtenção do operon constituído pelos genes *htrA* (XAC3980) a XAC3983

Para confirmação da transcrição do referido operon, foram realizadas reações de PCR utilizando como molde a primeira fita de cDNA a partir do RNA total de XAC 306 selvagem infectante 5 dias após a inoculação em folhas jovens de plantas de laranja Pêra Rio (5 DAI). Para isso, foram realizados os passos descritos a seguir.

3.2.1 Inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em folhas de citros e exsudação

Para o preparo do inóculo, a bactéria Xac 306 foi cultivada em meio de cultura NA por 48-72 horas a 28°C. Uma massa de células foi coletada e diluída em água bi-destilada estéril, sendo que a suspensão bacteriana foi ajustada para uma densidade ótica a 600nm (DO_{600nm}) igual a 0,3, equivalente a 10⁸ UFC/mL. Em seguida, a suspensão bacteriana foi inoculada na face abaxial de folhas jovens

de plantas de laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis*). A inoculação foi feita em todo o limbo foliar pelo método de infiltração por pressão, com uso de uma seringa hipodérmica plástica de 10 mL sem a agulha. Foram utilizadas aproximadamente 30 folhas para a inoculação. A recuperação das células bacterianas de Xac foi feita 5 dias após inoculação (DAI) pelo método de exsudação. Para tanto, as folhas inoculadas foram coletadas, picadas finamente no sentido lateral com auxílio de estilete estéril. Em seguida, as folhas picadas foram imersas em 100 mL de água bidestilada autoclavada e gelada em um béquer de vidro de 500 mL, seguido por uma agitação suave por 20 minutos com o béquer imerso em banho de gelo. Os restos foliares foram separados por filtração em duas camadas de gaze e as células bacterianas exsudadas foram recuperadas por centrifugação a 9000 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o RNA total das bactérias exsudadas foi extraído imediatamente, como descrito abaixo.

3.2.2 Extração de RNA total

O RNA total de “pellets” bacterianos exsudados de folhas de citros foi extraído utilizando o “kit RNeasy Protect Bacteria Mini” (Qiagen) conforme as recomendações do fabricante. Como sugerido pelo fabricante, todas as amostras foram tratadas com DNase livre de RNase, sendo mantidas a 37°C por 60 minutos para eliminar qualquer resquício de DNA nas amostras.

A qualidade do RNA total extraído foi verificada através de “NanoDrop 1000 Spectrophotometer” (Thermo Fisher Scientific), e a concentração foi quantificada com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) utilizando o “Qubit® RNA BR Assay kit”. Para averiguar possível contaminação com DNA na amostra, foi utilizado o “Qubit® DNA HS Assay kit” (Invitrogen).

3.2.3 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores dos operons XAC3981-3983 e XAC3980-3983

Inicialmente foi desenhado um oligonucleotídeo direto a partir do gene XAC3981 (XAC3981 F) e um reverso a partir do gene XAC3983 (XAC3983 R). A sequência de cada oligonucleotídeo está descrita na Tabela 2.

De acordo com a base de dados DOOR “Database of proCaryotic OpeRons” o tamanho do transcrito do operon XAC3981-XAC3983 a ser amplificado é de 1241 pb.

Foram desenhados também oligonucleotídeos para a amplificação do possível operon *htrA*-XAC3983: um oligonucleotídeo direto a partir do gene *htrA* (XAC3980 F) e o reverso utilizado foi o desenhado a partir do gene XAC3983 (XAC3983 R). Foram desenhados ainda oligonucleotídeos diretos (F) e reversos (R) para amplificar individualmente o gene *htrA* e os genes XAC3981, XAC3982 e XAC3983 (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do operon *htrA*-XAC3983 e para amplificação individual dos genes que o constituem.

Nome dos oligonucleotídeos	Sequência 5'→3'	“Amplicon” (pb)
XAC3981 F XAC3983 R	ATGAGCCCCACCAATACCGATCAG TCAGGCGGCGCGATCGGCGCGATC	1241
XAC3980 F XAC3983 R	ATGCGACCGCTGCCTACC TCAGGCGGCGCGATCGGCGCGATC	2795
XAC3980 F XAC3980 R	ATGCGACCGCTGCCTACC TCAACGCATCAGCGCGTC	1437
XAC3981 F XAC3981 R	ATGAGCCCCACCAATACCGAT TTAGTTGTCGTTGCTGCGTGC	363
XAC3982 F XAC3982 R	GTGAGCGATCAGGCCTCTCCC TCATGGACGTGCTCCACTGGCAG	486
XAC3983 F XAC3983 R	ATGAAATTTGGAACCTTGCGTCAACGC TCAGGCGGCGCGATCGGCGCGATC	393

(F), sequência do oligonucleotídeo direto; (R), sequência do oligonucleotídeo reverso.

3.2.4 Síntese de cDNA e RT-PCR

A denominação RT-PCR “Reverse Transcriptase” corresponde a uma reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR). Não utiliza o DNA de cadeia dupla como molde e sim o RNA de cadeia simples. A partir do RNA, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma cadeia de DNA complementar (cDNA) na qual aplica-se a técnica de PCR para verificar a expressão gênica, uma vez que analisa o RNA responsável pela síntese proteica (Bustin e Nolan, 2004).

Para a síntese da primeira fita de cDNA foram utilizados 500 ng de RNA total de *Xac 306* selvagem em estado infectante e o “kit SuperScript III First Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR” (Thermo Fisher Scientific), segundo as

instruções do fabricante. Este cDNA foi utilizado em reações de PCR para obtenção do “amplicon” referente ao RNA mensageiro do operon XAC3981-XAC3983 utilizando os oligonucleotídeos XAC3981 F e XAC3983 R e do operon htrA-XAC3983 utilizando os oligonucleotídeos XAC3980 F e XAC3983 R.

O produto esperado da amplificação do operon em cada situação é um fragmento de 1.241 pb e 2.795 pb, respectivamente.

3.3 Mutagênese sítio-dirigida por PCR para obtenção dos mutantes

3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

A metodologia escolhida para produzir os mutantes foi a mutação sítio-dirigida por PCR de extensão por sobreposição. Esse método consiste da inserção ou deleção de um fragmento de DNA por meio de duas etapas de PCR. A primeira etapa é chamada de PCR primária e a segunda de PCR secundária ou de ligação (Lee et al., 2004). Foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores para cada mutante a ser produzido, sendo o primeiro par denominado A-B, e o segundo par denominado C-D. Aos oligonucleotídeos B e C é adicionada uma cauda com bases complementares às sequências dos próprios oligonucleotídeos. Sendo assim, a cauda do oligonucleotídeo B é composta pela sequência reversa complementar das nove primeiras bases do oligonucleotídeo C. Já a cauda do oligonucleotídeo C foi composta pela mesma sequência das últimas nove bases do oligonucleotídeo B. Devido à presença das caudas complementares, os fragmentos se unem pela complementariedade de dezoito pares de bases e ocorre a deleção da região localizada entre os oligonucleotídeos B e C.

Cada oligonucleotídeo foi desenhado a partir das sequências de nucleotídeos do genoma da Xac disponíveis para consulta na base de dados “Genbank” do “The National Center for Biotechnology Information” – NCBI e estão descritos na Tabela 3. O programa “SnapGene® Viewer” versão 4.1.2. foi posteriormente utilizado para uma segunda conferência das sequências de cada oligonucleotídeo e para a confirmação do correto anelamento nas regiões de interesse.

Tabela 3 - Descrição da sequência dos oligonucleotídeos que foram utilizados na mutação sítio dirigida por PCR de extensão por sobreposição e tamanho dos fragmentos (“amplicon”) resultantes das PCRs primárias e PCR de ligação.

Nome do produto	Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5'→3'*	“Amplicon” (pb)
Fragmento AB	XAC3982 A(F)	ATCCGAATTC	699
	XAC3982 B(R)	GTCTTTGCCTCCGGCAGCGGGAGAGGC	
Fragmento CD	XAC3982 C(F)	GCTGCCGGAGGCAAAGACGATGAGGCG	734
	XAC3982 D(R)	CGGGATCCACATGTGGCGCGCGATCT	
Fragmento AD	XAC3982 A(F)	ATCCGAATTC	1434
	XAC3982 D(R)	CGGGATCCACATGTGGCGCGCGATCT	
Fragmento AB	Reg. Intergênica Parcial A (F)	TGTTGAATTCAGCTTCAATCCGCAGGGC	748
	Reg. Intergênica Parcial B (R)	GGGGCTCATAATAGCACCGGGGGGGTG	
Fragmento CD	Reg. Intergênica Parcial C (F)	GGTGCTATTATGAGCCCCACCAATACC	669
	Reg. Intergênica Parcial D (R)	CGGGATCCCGCAGTGAAAAACATCGC	
Fragmento AD	Reg. Intergênica Parcial A (F)	TGTTGAATTCAGCTTCAATCCGCAGGGC	1435
	Reg. Intergênica Parcial D (R)	CGGGATCCCGCAGTGAAAAACATCGC	
Fragmento AB 80/81	Reg. intergênica total A (F)	TGTTGAATTCAGCTTCAATCCGCAGGGC	690
	Reg. intergênica total B (R)	GGGGCTCATTCAACGCATCAGCGCGTC	
Fragmento CD 80/81	Reg. intergênica total C (F)	ATGCGTTGAATGAGCCCCACCAATACC	686
	Reg. intergênica total D (R)	CGGGATCCCGCAGTGAAAAACATCGC	
Fragmento AD 80/81	Reg. intergênica total A (F)	TGTTGAATTCAGCTTCAATCCGCAGGGC	1377
	Reg. intergênica total D (R)	CGGGATCCCGCAGTGAAAAACATCGC	
Fragmento AB 79/80	Reg. intergênica total A (F)	CATCGAATTCGGTTTGCTTGGCGACCG	682
	Reg. intergênica total B (R)	CGGTCGCATTATGAGCAACGGCAATGGT	
Fragmento CD 79/80	Reg. intergênica total C (F)	TTGCTCATAATGCGACCGCTGCCTACC	824
	Reg. intergênica total D (R)	CATGGATCCACATTGCGCGCCAGGTTG	
Fragmento AD 79/80	Reg. intergênica total A (F)	CATCGAATTCGGTTTGCTTGGCGACCG	1506
	Reg. intergênica total D (R)	CATGGATCCACATTGCGCGCCAGGTTG	

(F): sequência do oligonucleotídeo direto (“Forward”); (R): sequência do oligonucleotídeo reverso (“Reverse”). *As sequências em vermelho e em verde dos oligonucleotídeos A e D correspondem, respectivamente, aos sítios de restrições das enzimas *EcoRI* e *BamHI*.

Nas Figuras a seguir (Figuras 2 a 5) pode-se observar os locais de anelamento dos oligonucleotídeos A, B, C e D no genoma da Xac 306 para cada mutante produzido neste estudo. Todos são flanqueados por aproximadamente 700 pares de bases de DNA em cada lado da região a ser deletada.

```
>NC_003919.1:4674628-4676513 Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306,
complete genome
TGCCTCAGTCGGGCATCACCGGGGTGATGGTGAGCGAGGTCAAACGCGGCGGTGCGCTGCCGCCAACGGCC
TGGTCGCCGGCGATGTGATCGTGGCCAGCAGCGTGGGCGAGTTCGCCGACCTTGCCAGCTGGCGGGGCCAATT
TCCAACGTAAACCGCAGCAGCTTGTCTGTCGTATCCTGCGTGGCAACGCGCAGTACGACGCGCTGATGCGTT
GACGCACTGTGTACCGAAAGTTGGTTGCACTAACGCCTCCTACACCCCCCGGTGCTATTGCTACCGCTCGA
CCGACGTGAGTGGCGGCTGCCATCAATGACCGAAGGAGATATCGCATGAGCCCCACCAATACCGATCAGCT
GAAGGAAAACCTGAGCGAAGCCGGCACCCATCTGAAGTCGGCCGCAAACGCCGCCGGCGAAGCCGTCAGGGG
TGCGACCAGCGCCGCCGGCGATGAGCTCAAGCTCGGTGCGGCCAACGTCAAGGCCGAAGTGTCCGACACCGC
GCTGGCCGGCATGGCCGCTGCCGAGTTCGGCGGTGCCGCTGCCAAGGAGCAGATCGACGTCCTGGTTGCCAA
GGGCAACGATCTGCTGGAAGCGCCACCGATCTGATCCGCGAGCGTCCGCTGGCCGCTTCGGCGTTGCCTT
CGCCGCTGGCTGGGTCAATTGCCAAGCTGGCAGCAGCAACGACAACCTAAGTCGTGAGCGATCAGGCCTCTCC
CGCTGCCGGAACCGACGCGCCAGACGCGCGCGCGCAAACGCCAGGACTGGACGAAAGCGTACGTGCGGTGCG
CGCCGCCGGCCGTGCCACGCTGGGCTCGGCCAAGGACACCAGTCGCGCCTTGCGCCGGGTGGTGTGCGGTGA
TCTGCAACTGGCACGCGCAGCGCATTCGGGCGAGGCCTGGCCTGGGCCTGCGTGGCCGTGGTGTTCGGTGCCTC
GTCATGGTTATTGCTGGCTGGCGCCATCATCGCCCTGCTGCAGCGTGCCGGGTGTCGTGGTTCCAGGCGAT
GTTTTTCACTGCGTTGGCGAGTCTGTTGGTGACCGGCATTGCGGCATGGCGTGTGTTCTTCTACTTCGACCA
TACCGGCATGAATGCAACGCGCCGTCAGCTCATCAAGCTTGGGATTTTCGATGACCCGGCAAAGACGATGA
GGCGGCGACCTCTGCCAGTGGAGCACGTCCATGAAATTTGGAACCTTGCGTCAACGCGTCGAACGCGCCGAA
TATCTGGTTCGAAGGACGTGCCCAAGAAACGCGCCTGCATTGGAGCGAACTCCGCCAGACCTGGCGTGCCGGG
TGTCTCCCACTGCGCATTATGACGGTGGGCTTCGGGCTGGGGTTTGTACCGGCCGTAATGAACCGCAAGCG
GCATTGGGGAGCATCGCCAGCAAGCTTGGCGGTATTCCCAAGCTTCTGCAGATGATCAGCACCATCTCCGCG
CTGTTACCGCGCACCGTGCGCAGGAAGCTTCCGAGCAGGCCGAACGTGCTGCAGACAATGCCGAGGAAGTG
GCAGCCGACCCGCCGGTGACCGTGGTGCAGGTCCCGGCCGATCGCGCCGATCGCGCCGCTGAGCGCGGAGG
ATATTACGGCGGCCAGCGCTCTGCCAGGCCGCTGTCGTTGGCGACCGCACATTGGCCTGTGCAAGTCATCG
ACGACCCGGAGCAACCGAGAATCCGTACCACGGCCGGACGAACATGTTCCGGCTCCGGCGCAGCACGCACGTA
CTACGCTTGGGATTGGTTCGAAGGAATGACTGCACCACGAACCCCGGATATAGGCGTCTGCGCCTTCCATTT
CTGCAGATGACTGCTCGCCGCGGTTGCTGGCCGATAGCAGCTCTGACATGCGGAGATCGCGCGCCACATGTG
GCGACTTAGCTTCG
```

Figura 2. Localização dos oligonucleotídeos A, B, C e D, desenhados para o mutante Δ XAC3982, e sequência de nucleotídeos da ORF XAC3982 em formato FASTA, disponível no banco de dados “Genbank” (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A seta preta indica o início da ORF XAC 3982 e os três nucleotídeos em vermelho indicam o códon de terminação. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão sublinhadas em negrito e indicadas pelas cores rosa, verde, roxa e marrom, respectivamente.

>NC_003919.1:c4675662-4674145 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, complete genome

TCAACACCGCC**AGCTTCAATCCGCAGGGC**AGCATGGCCGGCAATATCGGCCTGGGGCTGGCGATTCCGTCCA
ACCTGGCGCGCAATGTCGTCGAGCAATTGGTGACCAAGGGCGTGTTGGTGCGCGGCACGCTCGGCCTGGAGA
CCCAGAACCTCACCAACAGATGCTGCAGGGCCTGGGGGTGGATTTCGTTGCGCGGCGCATTGGTGACACGGG
TGTTGCCGGGCTCCGCAGCGGCGGCGGCAGGCGTGCAACCGGGCGATGTCGTGGTGCGGGCCAACGACCAGC
GCGTGACAGCGCCGAAGCGCTGCACAACCTACGAAGGCCTGCAGGCGGTTGGCAGTGCGGTGACCCTGGATA
TCCGTGCGGATGGCAAGCCGCTCAAACCTCAAGGCCACGCTGAGAGAGCAGGACCGCGCCATCACCGGCGACA
TGCTGGACCCGCGTCTGACCGGCGCGACCTTCGTCGATCTCCCCGAATCGCTGCGTCAGTCGGGCATCACCG
GGGTGATGGTGAGCGAGGTCAAACGCGGCGGTGCGCGCTGCCGCCAACGGCCTGGTCGCGGCGCATGTGATCG
TGGCCAGCAGCGTGGGCGAGTTTCGCCGACCTTGCCAGCTGGCGGGCCAATTTCCAACGTAAACCGCAGCAGC
TTGTGCTGCGTATCCTGCGTGGAACGCGCAGTACGACGCGCTGATGCGTTGACGCACTGTGTACCGAAAGT
TGTTTGCCTAACGCCTCCTA**CACCCCCCGGTGCTATT**GCTACCGCTCGACCGCACGTGAGTGCGGGCTGC
CATCAATGACCGAAGGAGATATCGC**ATGAGCCCCACCAATACC**GATCAGCTGAAGGAAAACCTGAGCGAAGC
CGGCACCCATCTGAAGTCGGCCGCAAACGCGCGCGGCGGAAGCCGTCAGGGGTGCGACCAGCGCCGCCGCGCA
TGAGCTCAAGCTCGGTGCGGCCAACGTCAAGGCCGAAGTGTCCGACACCGCGCTGGCCGGCATGGCCGCTGC
CGAGTTCCGGCGGTGCCGCTGCCAAGGAGCAGATCGACGTCCTGGTTGCCAAGGGCAACGATCTGCTGGAAAG
CGCCACCGATCTGATCCGCGAGCGTCCGCTGGCCGCCCTTCGGCGTTGCCTTCGCCGCTGGCTGGGTGCTTGC
CAAGCTGGCAGCAGCAACGACAACCTAAGTCGTGAGCGATCAGGCCTCTCCCGCTGCCGGAACCGACGCGCC
AGACGCGCGCGCGCAAACGCCAGGACTGGACGAAAGCGTACGTGCGGTGCGCGCCGCCGGCCGTGCCACGCT
GGGCTCGGCCAAGGACACCAAGTCGCGCCTTGCGCCGGCTGGTGTCGGCTGATCTGCAACTGGCACGCAGCGC
ATTCGGGCGAGGCCTGGCCTGGGCTGCGTGGCCGTGGTGTTCCGGTGCTCGTCATGGTTATTGCTGGCTGG
CGCCATCATCGCCCTGCTGCAGCGTGCCGGGCTGTGCTGGTTCCAG**GCGATGTTTTTCACTGCG**TTGGCGAG
TCTGTT

Figura 3. Localização dos oligonucleotídeos A, B, C e D, desenhados para o mutante Δ RIP3980/81, e sequência de nucleotídeos em formato FASTA da região intergênica a montante do gene XAC3981, disponível no banco de dados *Genbank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A seta preta indica o início do gene XAC3981 e porção com fundo em cor cinza compreende toda a região intergênica entre o gene *htrA* (XAC3980) e a ORF XAC3981. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão sublinhadas em negrito e indicadas pelas cores rosa, verde, roxa e marrom, respectivamente.

>NC_003919.1:4674145-4675663 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, complete genome

TCAACACCGCC**AGCTTCAATCCGCAGGGC**AGCATGGCCGGCAATATCGGCCTGGGGCTGGCGATTCCGTCCA
ACCTGGCGCGCAATGTCGTCGAGCAATTGGTGACCAAGGGCGTGTTGGTGCGCGGCACGCTCGGCCTGGAGA
CCCAGAACCTCACCAACAGATGCTGCAGGGCCTGGGGGTGGATTTCGTTGCGCGGCGCATTGGTGACACGGG
TGTTGCCGGGCTCCGCAGCGGCGGCGGCAGGCGTGCAACCGGGCGATGTCGTGGTGGCGGCCAACGACCAGC
GCGTGGACAGCGCCGAAGCGCTGCACAACTACGAAGGCCTGCAGGCGGTTGGCAGTGCGGTGACCCTGGATA
TCCGTGCGGATGGCAAGCCGCTCAAACCTCAAGGCCACGCTGAGAGAGCAGGACCGCGCCATCACCGGCGACA
TGCTGGACCCGCGTCTGACCGGCGCGACCTTCGTCGATCTCCCCGAATCGCTGCGTCAGTCGGGCATCACCG
GGGTGATGGTGAGCGAGGTCAAACGCGGCGGTGCGCGCTGCCGCCAACGGCCTGGTCGCGCGCGATGTGATCG
TGGCCAGCAGCGTGGGCGAGTTTCGCCGACCTTGCCAGCTGGCGGGCCAATTTCCAACGTAAACCGCAGCAGC
TTGTGCTGCGTATCCTGCGTGGCAACGCGCAGTAC**GACGCGCTGATGCGTTGA**CGCACTGTGTACCAGAAAGT
TGGTTGCACTAACGCCTCCTACACCCCCCGGTGCTATTGCTACCGCTCGACCGCACGTGAGTGGCGGCTGCG
CATCAATGACCGAAGGAGATATCGC**ATGAGCCCCACCAATACC**GATCAGCTGAAGGAAAACCTGAGCGAAGC
CGGCACCCATCTGAAGTCGGCCGCAAACGCGCCGCGCAAGCCGTCAGGGGTGCGACCAGCGCCGCCGCGCA
TGAGCTCAAGCTCGGTGCGGCCAACGTCAAGGCCGAAGTGTCCGACACCGCGCTGGCCGGCATGGCCGCTGC
CGAGTTCCGGCGGTGCCGCTGCCAAGGAGCAGATCGACGTCCTGGTTGCCAAGGGCAACGATCTGCTGGAAAG
CGCCACCGATCTGATCCGCGAGCGTCCGCTGGCCGCCCTTCGGCGTTGCCTTCGCCGCTGGCTGGGTGCTTGC
CAAGCTGGCAGCAGCAACGACAACCTAAGTCGTGAGCGATCAGGCCTCTCCCGCTGCCGGAACCGACGCGCC
AGACGCGCGCGCGCAAACGCCAGGACTGGACGAAAGCGTACGTGCGGTGCGCGCCGCCGGCCGTGCCACGCT
GGGCTCGGCCAAGGACACCAAGTCGCGCCTTGCGCCGGCTGGTGTCGGCTGATCTGCAACTGGCACGCAGCGC
ATTCGGGCGAGGCCTGGCCTGGGCTGCGTGGCCGTGGTGTTCGGTGCCCTCGTCATGGTTATTGCTGGCTGG
CGCCATCATCGCCCTGCTGCAGCGTGCCGGGCTGTCGTGGTTCCAG**GCGATGTTTTTCACTGCG**TTGGCGAG
TCTGTT

Figura 4. Localização dos oligonucleotídeos A, B, C e D, desenhados para o mutante Δ RIT3980/81, e sequência de nucleotídeos em formato FASTA da região intergênica a jusante do gene *htrA* (XAC3980), disponível no banco de dados “Genbank” (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os nucleotídeos com fundo em cor cinza compreendem a região intergênica entre o gene *htrA* (XAC3980) e a ORF XAC3981. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão sublinhadas em negrito e indicadas pelas cores rosa, verde, roxa e marrom, respectivamente.

>NC_003919.1:4672104-4674274 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, complete genome

ACGTATGGCGTCGCTCCGTACCCCTCAGCCCAATCCCTGTCCCGCAGGAGAGGGGCGTTAGTCAAAGCCGCTG
 CAACAAAAAAGCCGACGCCGTGAAAACAGCGCCGGCTTTTTTCGACATTGCACATGGTTCATGGCACATGGCG
 CGTGCGCTGCACGCGTCTACGCTAAGCGGCCAGGCAACTCACCTGCGCCGCGAGCGTGACAACCTCAACG
 CGTGACGCGCTTTGCCGCTTTCTTGCCCACTGCCTTGCGCGCGGGCGGTGGTCTTTGCCACGGCACGCGTGGC
 CGGGGTCTTGGTCACCTTGGCGGCTTTCTTCAACGCGGTCTTGGTCACGGCCTTCTTGAGCGGGGCTTCTT
 CACTGCGGCCTGCCTGGTCGCGGTTTGCTTGGCGACCGCGCCTTCTTGCTGCAGGCTTGACCAACGTCTT
 CTTTCGCTGCCGCCGGCTTGGCTGCTGCCTTCTTGCTGCCTTCTTCGCCGCCGTGCGCGCGTTACCGTTGC
 AACGGCGGTCTTGCCTGCGCGCGCTTGGCGCGGTCTTGGCATTAGTGCGGCCGCTTCGGCCCTGGCATT
 GGCCTTGGCGGTTTCCAGCTTGCCTGCGCTGGTATTGGCCTTGGTGCTGTGTGAGCTTCTGCTTGGCCGCGCGCT
 GGTGCTGCTCAACTTCTGCTTGGCGGCTGCGTGGTGCAGGTCAACGTTTGGCTTGGCCACGTCTTGGTGGC
 GGTGAGCTTCTGCTTGGCGGCTCCTTGGTGGCGACAGCTTGTCTTGGCAGCGTCTTGGTGGCCGCCAG
 CGAGCGCTTGGTCTTGGCCACGCTGCGTTTCACTGCGCTGGCCGAGTGCCGGCGTTCTGGCCACGTCTT
 TTCGACCTTGACCAACGCTTGCCTTGGCCACCTGCGTCTTGACCTCTTCCACCGCCGTGCTGCGAGC
 CTCCTGACGCTGGCAACCGCCTGCTGGCGGTGCTGGCGATGGTCTCGGTCAACTCGGTGGCGGTGCTTTT
 TACGCTATCGACGGCGTCGGACAGGGTTGCCGTTACACCATGGCGTTGCTCATAGACCCTCCTTAAGGGCG
 TCAGTGCGGGAACTTAGGCGATGCGCGACGGCACGCAACATGCTGAACAGGCATCGGATCAAGCGGACGCT
 ACGCCCGGCTGCGGGGCTGTCAACGCAATCAGGGCAAGGGATGTGCGGCACTTTCACCGGCAGTTAAATTG
 CATGCGGGCACTCTCGTTTCACTTGGATTACGTAGTCAGACGCCCTATTCCTCATCCACCGCGTAACCCGGA
 ATCCGTTCCATCGACCGCTGCGTACCTGCTGACTCTTTCGCTGGCCGCTGCCTTCGGCGGCTTTGCCGCC
 ACCGGCATCAACGCTGGCTCGACAATCGCGCCGAAGCCACACCCCCAGCAACGCCGCTTTACCTTGCCG
 ACGGCCGCCGATTGCCGGCGGGTGGCCGGCCAACCTGTGCCGTGCTGGCGCGGATGCTGCAGCAGGCC
 ATGCCCCGGTGGTGAGCGTGAACACCAAAACAGGTGGTGCCTGCGGTCGCAACCCGTTCTTCAACGACCCGATC
 CTGCGCCGGCTGTTTCCGCGAGGTGCCGAGGACCGCATCAACGAGTGCCTGGGTTCCGGCGTGATCATCGAT
 GCGCAAAAAGGGTATGTCTGACCAATCACCACGTATCGAAAACGCCGACGACGTGCAGGTGACGCTCGGC
 GACGACGCGACGGTCAAGGCCGAGTTTATCGGCTCCGATGCCGATACCGATATTGCGCTGATCCGCATCAAG
 GCCGACAACCTCACCGATATCAAACTGGCCGACAGCAACGCGCTACGCGTGGGCGATTTTGTGGTGGCCATC
 GGCAACCCGTTCCGCTTACCCAGACCGTCACTCCGGCATCGTCTCGGCAGTGGGGCGCAGCGGGATTTCG
 GGCTTGGGCTACAGAACTTCACTCCAGACCGATGCCTCGATCAACCCCGGCAACTCGGGCGGCGCGCTGGT
 AACCTGCAAGGCCAGTTGGTTGGCATCAACACCGCCAGCTTCAATCCGCGAGGGCAGCATGGCCGGCAATATC
 GGCCTGGGGCTGGCGATTCCGTCCAACCTGGCGCGCAATGTGCTCGAGCAATTGGTGACCAAGGGCGTGGTG
 GTGCGCGGCA

Figura 5. Localização dos oligonucleotídeos A, B, C e D, desenhados para o mutante Δ RIT3979/80, e sequência de nucleotídeos em formato FASTA da região intergênica a montante do gene *htrA* (XAC3980), disponível no banco de dados “Genbank” (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A seta preta indica o início do gene *htrA* e os nucleotídeos com fundo em cor cinza compreendem toda a região intergênica entre o gene *bph1* (XAC3979 - localizado na fita complementar do genoma da Xac 306) e o gene *htrA*. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão sublinhadas em negrito e indicadas pelas cores rosa, verde, roxa e marrom, respectivamente.

Para confirmar que as mutações não afetam a transcrição dos genes a montante (XAC3979) e a jusante (XAC3984) dos possíveis operons, foram também desenhados oligonucleotídeos diretos e reversos para amplificar esses genes (Tabela 4).

Todos os oligonucleotídeos desenhados tiveram sua especificidade validada pelo uso da ferramenta Blastn, disponível no NCBI (NCBI: txid190486), onde foi contrastada a sequência de cada oligonucleotídeo contra o genoma completo da Xac 306 (Apêndice B).

Tabela 4. Oligonucleotídeos específicos para a amplificação dos genes *bpH1* (XAC3979) e XAC3984.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5'→3'	“Amplicon” (pb)
XAC3979 F	ATGAGCAACGGCAATGGTGTA	852
XAC3979 R	TCAACGCGTGACGCGCTT	
XAC3984 F	ATGGCACGCATGTTGCGC	345
XAC3984 R	TCACGGCGGCCAGCGCTC	

O vetor suicida pNPTS138 foi utilizado para a produção dos mutantes de Xac que continham as deleções do gene ou das regiões intergênicas específicas (anteriormente citadas). Esse vetor possui um marcador de resistência a canamicina, um gene que codifica a b-galactosidase (LacZ) e outro que confere sensibilidade a sacarose (SacB), além de múltiplos sítios de clonagem e da capacidade de se transferir por conjugação.

A clonagem dos fragmentos de interesse na região “polylinker” do vetor pNPTS138 é facilitada com o uso das enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*, cujos sítios de clivagem foram desenhados nos oligonucleotídeos A e D (Tabela 3) e correspondem às mesmas enzimas utilizadas para a clivagem do vetor.

3.3.2 Reação de PCR para a obtenção dos fragmentos AB, CD e AD

As reações de PCR para a obtenção dos fragmentos AB e CD foram preparadas separadamente para cada par de oligonucleotídeos. Cada reação consistiu em 50 ng de DNA genômico da Xac 306, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 U de “Phusion® High Fidelity DNA Polymerase” (“Thermo Scientific”), 1 X do tampão da enzima, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 5,0% de DMSO (Dimetilsulfóxido) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 20 µL. 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 de amplificação, as amostras foram submetidas à uma etapa de desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 62°C (para a XAC3982) e 69°C (para as regiões intergênicas) 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, seguido 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%, com 0,5 X de tampão TBE (Tris-Borate-EDTA) (5,0 X TBE: 54 g/L de Tris base, 27,5 g/L de ácido bórico, 20 mL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0, q.s.p. 1L com H₂O MiliQ) e coloração com 10 mg/mL de brometo de etídio. Os fragmentos amplificados foram visualizados por exposição à luz ultravioleta, e fotodocumentados no fotodocumentador Molecular Imager Gel DocTM XR+ Imaging System (BIORAD). 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 molde 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 nesse momento foram utilizados os oligonucleotídeos A e D. a temperatura de anelamento foi de 63°C (XAC3982) e 69°C (demais regiões intergênicas). A amplificação dos segmentos A-D foram verificadas por eletroforese em gel de agarose (1,0%), e as bandas com tamanhos correspondentes ao esperado 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”).

3.3.3 Reação de digestão com endonucleases de restrição dos fragmentos AD-XAC3982, AD-RIP3980/81, AD-RIT3980/81 e AD-RIT3979/80

Inicialmente o vetor pNPTS138 foi submetido a uma reação de digestão dupla com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI. A reação foi composta por

30 µg de DNA (vetor fechado), 30 U da enzima *Bam*HI (Fermentas), 15 U da enzima *Eco*RI, 2X do tampão de digestão “Tango® Buffer” (Fermentas) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 60 µL. A reação foi incubada a 37°C por 16 horas e as enzimas foram inativadas por desnaturação a 65°C por 20 minutos.

As reações de digestão dos fragmentos AD-XAC3982, AD-RIP3980/81, AD-RIT3980/81 e AD-RIT3979/80 foram realizadas com as mesmas enzimas e nas mesmas condições utilizadas para digerir o vetor, porém usando 1,0 µg de cada fragmento, 10U da enzima *Bam*HI (Fermentas), 5U da enzima *Eco*RI, 2X do tampão de digestão “Tango® Buffer” (Fermentas) e água ultrapura estéril, totalizando um volume final de reação de 100 µL.

Para a confirmação da digestão do vetor pNPTS138, o produto gerado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,0% e o fragmento correspondente ao vetor aberto foi purificado com o “kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Os fragmentos A-DXAC3982, A-DRIP3980/81, A-DRIT3980/81 e A-DRIT3979/80 digeridos foram purificados pelo método de fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989) e em seguida as concentrações de cada DNA, assim como a concentração do vetor pNPTS138, foram determinadas no espectrofotômetro “NanoDrop® ND-1000” (Thermo Scientific).

3.3.4 Clonagem em vetor pNPTS138 e transformação em células de *E. coli* DH10B quimicamente competente

A reação de ligação de cada fragmento ao vetor pNPTS138 foi preparada em um volume final de 20 µL contendo 150 ng do fragmento a ser clonado, 50 ng de vetor, 1 X de tampão de ligação, 4 U da enzima T4 DNA ligase (Fermentas), sendo o volume completado com água ultrapura estéril. A reação foi mantida em termociclador a 16 °C por 16 horas.

Os produtos das ligações no vetor pNPTS138 deram origem às construções pNPTS138-ΔXAC3982, pNPTS138-ΔRIP3980/81, pNPTS138-ΔRIT80/81 e pNPTS138-ΔRIT79/80. Essas construções foram usadas para

transformar células de *Escherichia coli* DH10B quimicamente competentes, preparadas como descrito em Sambrook et al. (1989). A confirmação da clonagem foi feita por meio da extração do DNA plasmidial de algumas colônias brancas obtidas na transformação, seguida de reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos do vetor. Os vetores contendo os “amplicons” de interesse foram enviados para sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos M13pUC Foward -20 (GTAAAACGACGGCCAGT) e M13pUC Reverse -24 (GGAAACAGCTATGACCATG), que flanqueiam a região onde ocorreu a inserção no vetor pNPTS138. Os oligonucleotídeos foram gentilmente cedidos pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Unesp/FCAV.

3.3.5 Transformação em células eletrocompetentes de Xac 306

Para a obtenção dos mutantes foram preparadas células de Xac eletrocompetentes de acordo com o protocolo descrito por Amaral (2005), com modificações. Para tal, a Xac 306 foi recuperada da preservação em água de torneira estéril, plaqueada em meio NA e incubada a 28°C por 72 horas para cultivo. Posteriormente, com auxílio de alça de platina, uma porção de massa bacteriana foi transferida para um Erlenmeyer de 50 mL contendo 5 mL de meio líquido NB. Esse pré-inóculo foi feito no início da manhã e foi mantido a 28 °C sob agitação a 200 rpm (agitador Innova 4430, “New Brunswick Scientific”) por aproximadamente 12 horas. Ao 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 mantido a 29°C sob agitação contínua de 200 rpm, até atingir uma densidade óptica (DO_{600nm}) entre 0,5 e 0,8, o que demorou aproximadamente 16 horas.

Em seguida, a cultura bacteriana foi transferida para tubos tipo Falcon estéreis de 50 mL e centrifugada a 4.000 x g por 15 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado bacteriano de cada tubo foi ressuspenso em 50 mL de água ultrapura estéril, seguido de nova centrifugação como descrito acima. O precipitado foi lavado mais duas vezes consecutivas e ao final do processo juntou-se todo o conteúdo em um único tubo. As células foram aliqüotadas em microtubos do tipo “eppendorf” de 1,5

mL (100 μ L de célula em cada tubo) e imediatamente utilizadas para transformação por eletroporação.

A eletroporação foi realizada em equipamento “Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems” (BioRad) onde 4 μ L de DNA plasmidial das construções pNPTS138- Δ XAC3982, pNPTS138- Δ RIP3980/81, pNPTS138- Δ RIT3980/81 e pNPTS138- Δ RIT3979/80, na concentração final de 1000 ng, foram adicionados a 100 μ L de células competentes e transferidos para uma cubeta de eletroporação. Para o controle da reação, 100 μ L de células da Xac 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 2 mm (BioRad), pulso elétrico de 2.500 Volts e tempo de condução (TC) igual a 2,6 milissegundos.

Após a eletroporação foi adicionado à solução 1 mL de meio NBY suplementado com sacarose 20% e 10 mM MgSO₄. A solução foi transferida para um tubo tipo “Falcon” de 15 mL, o qual foi mantido por agitação em equipamento “Innova 4430 Incubation Shaker” por 4 horas, 29 °C, a 140 rpm. Em seguida, 200 μ L de cada suspensão foi plaqueada em meio NA contendo canamicina (30 μ g/ml) e incubada em BOD a 29°C por 72 horas, para seleção das colônias contendo o vetor.

3.3.6 Seleção e confirmação dos mutantes

As colônias resultantes da transformação foram selecionadas num primeiro momento a partir da resistência do vetor pNPTS138 à canamicina. Essas colônias foram utilizadas em uma segunda etapa de seleção, de modo que uma mesma colônia foi transferida para o meio NA e para meio NA suplementado com 5% de sacarose. O pNPTS138 possui sensibilidade a sacarose; consequentemente, nesse segundo evento as colônias que ainda possuam o vetor não crescem nessa condição. As colônias que cresceram em NA, mas não cresceram em NA mais sacarose foram selecionadas, esperando-se que nesse momento tenha ocorrido a troca, por recombinação homóloga, do gene inteiro, presente no cromossomo bacteriano, pelo gene deletado, contido no plasmídeo.

As colônias selecionadas foram multiplicadas em meio NB e utilizadas na extração de DNA genômico utilizando o “kit Wizard® Genomic DNA Purification” (Promega), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, para posterior confirmação da deleção gênica por meio de PCR com os oligonucleotídeos A e D. O produto resultante dessa PCR foi então purificado e enviado para sequenciamento com os mesmos oligonucleotídeos para a confirmação definitiva da deleção.

3.3.7 Confirmação da identidade da Xac 306 mutada

A confirmação da identidade da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 contendo os genes mutados foi feita por meio de PCR utilizando o DNA genômico dos mutantes e os oligonucleotídeos Xac01 (5'-CGCCATCCCCAC CACCACCACGAC-3') e Xac02 (5'-AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA-3'), específicos para Xac 306 (Colleta-Filho et al., 2006). Como controle positivo foi utilizado o DNA genômico de Xac 306, e como controle negativo o DNA genômico de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* das linhagens B (XauB) e C (XauC). 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.

3.4 Testes de patogenicidade

3.4.1 Testes de patogenicidade por infiltração, perfuração e pulverização para os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81

Para o ensaio de patogenicidade, as plantas hospedeiras utilizadas foram a laranja doce 'Hamlin' (*Citrus sinensis* Osbek) e a citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) consideradas suscetíveis, e a tangerina 'Ponkan' (*Citrus reticulata*), considerada resistente ao cancro cítrico (Gottwald, Graham, Schubert 2002). Suspensões bacterianas de Xac 306 selvagem e dos mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81 foram ajustadas para 10^8 UFC/mL ($DO_{600\text{ nm}} = 0,4$) e para 10^6 UFC/mL (por diluição) em tampão fosfato estéril 1X. As suspensões de células bacterianas (10^6 UFC/mL) foram infiltradas por pressão na face abaxial das folhas, usando uma seringa plástica de 10 mL sem a agulha. Os mutantes foram infiltrados à direita da nervura central, enquanto que no lado esquerdo foi inoculado a estirpe selvagem. As suspensões bacterianas (10^8 UFC/mL) foram também inoculadas por perfuração do limbo foliar com agulhas de 0,55 mm de diâmetro. Foram feitas três réplicas por planta e o experimento foi repetido três vezes, tanto para o método de infiltração como para o método de perfuração.

Plantas de laranja doce 'Hamlin' com folhas jovens também foram individualmente aspergidas com 50 mL de cada suspensão bacteriana (10^8 UFC/mL) dos mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81. A observação dos sintomas nos experimentos foi acompanhada até o trigésimo dia, exceto para a perfuração que foram acompanhados até o sexagésimo dia.

Para todos os testes de patogenicidade as plantas utilizadas nos experimentos foram mantidas em laboratório de segurança do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, Brasil). Este laboratório possui um sistema de filtragem absoluta do ar (filtros HEPA), um sistema para gerar pressão negativa, impedindo, desta maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente, além de manter condições ótimas de temperatura (28°C), luminosidade e umidade.

3.4.2 Teste de patogenicidade por infiltração para os mutantes Δ RIT3980/81 e Δ RIT3979/80

A patogenicidade para os mutantes Δ RIT3980/81 e Δ RIT3979/80 foi avaliada pelo método de infiltração por pressão em folhas de laranja doce 'Hamlin' e em tangerina 'Ponkan', com as suspensões bacterianas na concentração de 10^6 UFC/mL, sendo inoculadas na face abaxial das folhas com o uso de uma seringa plástica de 10 mL sem a agulha. A observação dos sintomas foi acompanhada até o trigésimo dia.

Estes dois mutantes produzidos pela deleção total das regiões promotoras dos operons foram produzidos na etapa final deste projeto. Diante do pouco tempo disponível para explorar e identificar a função, assim como os demais mecanismos que poderiam estar envolvidos na regulação desses operons, priorizou-se confirmar qual era o efeito dessas deleções na patogenicidade da bactéria, já que esta era uma informação primordial. Diante disso, os experimentos realizados com os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81 (descritos nos próximos tópicos), não foram realizados para os mutantes Δ RIT3980/81 e Δ RIT3979/80.

3.5 Experimentos realizados para os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81

3.5.1 Inoculação em planta não hospedeira

Folhas de pimenta [*Capsicum baccatum* var. *praetermissum* (Heiser & P. G. Smith) Hunz)], uma planta não hospedeira de Xac, foram inoculadas com suspensões bacterianas (ajustadas em tampão fosfato 1X para 10^8 UFC/mL) de Xac 306 selvagem e dos mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81. As suspensões bacterianas contendo 10^8 UFC/mL, 10^7 UFC/mL e 10^6 UFC/mL foram infiltradas na parte abaxial das folhas. Os sintomas de reação de hipersensibilidade (HR) foram observados por 10 dias.

3.5.2 Curva de crescimento bacteriano *in planta*

A estirpe 306 da Xac e os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81 foram submetidos a inoculações em folhas jovens de laranja 'Hamlin' para avaliação do crescimento bacteriano no tecido vegetal, após a infecção. As inoculações consistiram de perfuração do limbo foliar com agulhas de 0,55 mm de diâmetro imersas previamente nas suspensões bacterianas. Para cada isolado foram inoculadas cinco folhas, com oito perfurações por folha, sendo quatro de cada lado da nervura central.

Para avaliar o crescimento bacteriano, discos foliares foram retirados das folhas aos 0, 1, 3, 6, 9, 11,15 e 20 DAI. Para tanto, foi utilizado um cortador de folhas de aproximadamente 1 cm de diâmetro e quatro discos foliares contendo o sítio de inoculação no centro foram retirados aleatoriamente.

Os discos das folhas foram macerados em 1mL de tampão fosfato 1X estéril e diluições em série (10^{-1} a 10^{-6}) foram preparadas. Uma gota de 10 μ L de cada diluição foi depositada na superfície do meio sólido NA. As placas foram mantidas a 29° C por 36 horas, e colônias isoladas foram contadas. O experimento foi repetido independentemente três vezes.

As plantas utilizadas nos experimentos foram mantidas em laboratório de segurança do Laboratório de Biologia Molecular (UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP, Brasil), sob condições controladas de temperatura (28°C), luminosidade e umidade.

3.5.3 Ensaio de formação de biofilme em meios de cultura NB e XVM2

O biofilme produzido pelos mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81, e pela Xac 306 selvagem foi mensurado em duas condições. As suspensões bacterianas foram ajustadas para 10^8 UFC/mL em meio XVM2 suplementado com 1% de glicose (Rigano et al., 2007) e em meio NB (Yan e Wang, 2011), independentemente. Então, 1 mL de cada suspensão foi transferido para tubos de ensaio tipo borosilicato estéreis e mantidos sem agitação por 96 horas a 29°C. O meio de cultura foi retirado e lavado com água destilada estéril duas vezes. O biofilme formado nos tubos foi visualizado por coloração com 0,1% de corante

cristal violeta. As células fixadas com o corante foram dissolvidas em 1 mL de etanol/acetona 80/20 e quantificadas por espectrofotometria a 590nm. As médias de quatro repetições biológicas foram utilizadas para comparar a produção de biofilme da Xac 306 selvagem com a dos mutantes, e os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) por meio do “software” computacional AgroEstat® (Barbosa e Maldonado Jr, 2015).

3.5.4 Extração e quantificação de goma xantana

A goma xantana dos mutantes $\Delta XAC3982$, $\Delta RIP3980/81$ e da Xac 306 selvagem foi extraída de acordo com Lo et al. (1997), com modificações. Quatro colônias isoladas de cada linhagem foram inoculadas separadamente em 10 mL de meio NB e incubadas a 29°C, com agitação contínua a 180 rpm e, após 17 horas, as culturas tiveram suas densidades óticas a 600nm (DO_{600nm}) ajustadas para 0,3. Um volume de 2,5 mL de cada cultura bacteriana foi inoculado em 100 mL de meio goma xantana e incubados a 29°C, a 180 rpm, por 96 horas.

Após este tempo, as células em cultura foram centrifugadas a 10000 x g a 4°C por 40 minutos. Os sobrenadantes e os precipitados foram recuperados. Os precipitados bacterianos foram ressuspensos em 1mL de H₂O bidestilada estéril, transferidos para béqueres de vidro (com peso conhecido) e mantidos a 70°C por 24 horas, em seguida foram pesados para o cálculo do peso celular seco. Os sobrenadantes foram transferidos para béqueres de 500 mL contendo 4 g de KCl e foram mantidos sob agitação por 15 minutos e em seguida foram adicionados 200 mL de isopropanol gelado para a precipitação da goma. A goma produzida foi transferida para copos plásticos de pesos conhecidos, mantidos a 37°C por 72 horas e em seguida pesados. A razão do valor (peso) de goma pelo valor (peso) da massa seca de bactérias fornece a quantidade de goma produzida pela quantidade de bactéria presente no meio de cultura. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) por meio do “software” computacional AgroEstat® (Barbosa e Maldonado Jr, 2015).

3.5.5 Motilidade bacteriana

Os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81 foram testados quanto à motilidade tipo “swimming” e tipo “swarming” para verificar se as mutações tiveram algum efeito na motilidade bacteriana. A motilidade “swimming” foi avaliada com base no protocolo de Li e Wang (2011) com 0,3% de ágar. Para avaliar a motilidade do tipo “swarming” foi utilizado o meio NB com 0,7% de ágar (Malamud et al., 2011). Quatro colônias isoladas de cada estirpe foram transferidas para um tubo tipo “Falcon” de 50 mL contendo 10 mL de meio NB e incubadas a 29°C, sob agitação de 180 rpm por 16 h em equipamento “Innova 4430 Incubator Shaker”. Em seguida, foram aplicados 2 μ L dos inóculos com concentração ajustada para 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} de 0,3) no centro das placas contendo 20 mL dos meios semi-sólidos com 0,3% e 0,7% de ágar. As placas foram incubadas em estufa a 29°C por 72 horas e, após esse período, foi realizado o registro fotográfico. O diâmetro das colônias foi mensurado com o auxílio do software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) e a média do diâmetro das colônias foi utilizada para avaliar a motilidade. O experimento foi feito com quatro réplicas biológicas e quatro réplicas técnicas para os mutantes e para a Xac 306.

3.5.6 Diagnose, inoculação e reisolamento bacteriano

Para certificação de que todos os resultados obtidos com os experimentos realizados *in planta* tratavam-se das respectivas bactérias, foram realizados os testes descritos a seguir. A estirpe selvagem e os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81 de Xac foram inoculadas em folhas de laranja ‘Hamlin’ e, após quinze dias, as folhas inoculadas foram coletadas e realizada a exsudação da bactéria conforme descrito no item 3.2.1. O exsudado foi transferido para placas contendo meio de cultura NA e, após crescimento bacteriano, foi realizado a extração de DNA genômico. Os DNAs genômicos obtidos foram utilizados em reações de PCR com os oligonucleotídeos A e D de cada mutante (Tabela 3) que

flanqueiam as regiões de interesse deletadas, bem como oligonucleotídeos específicos para a Xac 306 (Xac 01 e Xac02).

3.6 Análises *in silico*

Foram realizadas análises para predição de operons utilizando as ferramentas DOOR – “Database of prOcaryotic OpeRons” (Mao et al., 2014), ProOpDB: “Prokaryotic Operon DataBase” (Taboada et al., 2011) e “Microbes Online Operon Predictions” (Dehal et al., 2010).

A ferramenta BPROM (“Bacterial Promoter Prediction Program”) da empresa Softberry (www.softberry.com) foi utilizada para predizer regiões promotoras e para verificar a probabilidade de existência de promotor a montante dos prováveis operons XAC3981-3983 e *htrA*-XAC3983 no genoma da Xac 306. A busca foi realizada na região que compreende o início do gene *bph1* (XAC3979, posição 4.673.409 pb) até o final do gene XAC3983 (posição 4.676.202 pb).

Para os três genes ainda hipotéticos desse operon (XAC3981, XAC3982 e XAC3983) foi verificada a presença de peptídeo sinal com a ferramenta Phobius (Bendtsen et al., 2004), foram feitos alinhamentos para identificar proteínas com homologia e domínios funcionais pelo UniProt (The UniProt Consortium, 2019) e foi feita a modelagem da estrutura tridimensional das respectivas proteínas hipotéticas com as ferramentas iTASSER (Yang et al., 2015) e Phyre2 (Kelley et al., 2015). Foi também utilizada uma ferramenta para a predição de proteínas transmembranas - TMPRED (Hofmann e Stoffel, 1993), de regiões hélices transmembrana em proteínas - TMHMM (Moller et al., 2001) e um banco de dados de grupos de genes ortólogos - OrthoDB (Kriventseva et al., 2018).

Para todos os recursos foi utilizada a sequência FASTA (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri* str. 306) de cada gene e/ou proteína, disponível no “National Center for Biotechnology Information” - NCBI.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mutagênese sítio-dirigida por PCR para obtenção dos mutantes Δ XAC3982, Δ RIP3980/81, Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81

Utilizando a técnica de mutação sítio dirigida por PCR foram obtidos os mutantes Δ XAC3982, Δ RIP3980/81, Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81. Os fragmentos AB, CD e AD obtidos pelas reações de PCR, referentes ao gene XAC3982 e a região intergênica parcial (RIP) XAC3980/81, região intergênica total XAC3979/80 e XAC3980/81 foram obtidos com os respectivos tamanhos esperados e podem ser observados na Figura 6 e 7. O Δ XAC3982 apresenta deleção de 84% do gene, enquanto o Δ RIP3980/81 apresenta deleção de 58 pb imediatamente a montante do início do gene XAC3981. Para o Δ RIT3980/81 foram deletados 116 pb a montante do início do gene XAC3981, o que compreende toda a região intergênica entre esse gene e o gene *htrA* (XAC3980). Da mesma forma, o mutante Δ RIT3979/80 possui deleção de toda a região intergênica entre o gene *bpH1*(XAC3979) e o gene *htrA* (XAC3980), o que equivale a 243 pb.

Os fragmentos amplificados nas PCRs possuem os tamanhos previstos para os mutantes Δ XAC3982, Δ RIP3980/81, Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81, sendo eles: 699 pb, 767 pb, 682 pb e 690pb (fragmento AB), 734 pb, 696 pb, 824 pb e 686 pb (fragmento CD) e 1.434 pb, 1.409 pb, 1.506 pb e 1.377 pb (fragmento AD), respectivamente.

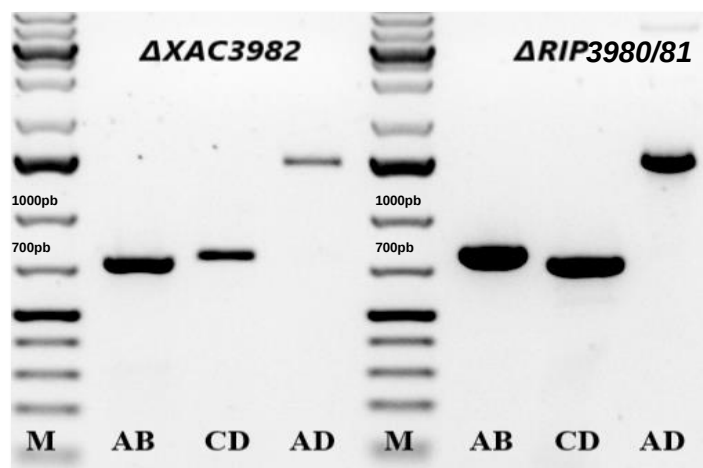


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos resultantes das PCRs primárias (**AB** e **CD**) e de ligação (**AD**) para os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81, onde o tamanho do fragmento AD corresponde ao gene já deletado. M – Padrão de peso molecular (*GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder*, Fermentas). Δ XAC3982 - **AB**: fragmento AB (699 pb), **CD**: fragmento CD (734 pb) e **AD**: fragmento AD (1.434 pb). Δ RIP3980/81 - **AB**: fragmento AB (767 pb), **CD**: fragmento CD (696 pb) e **AD**: fragmento AD (1.409 pb).

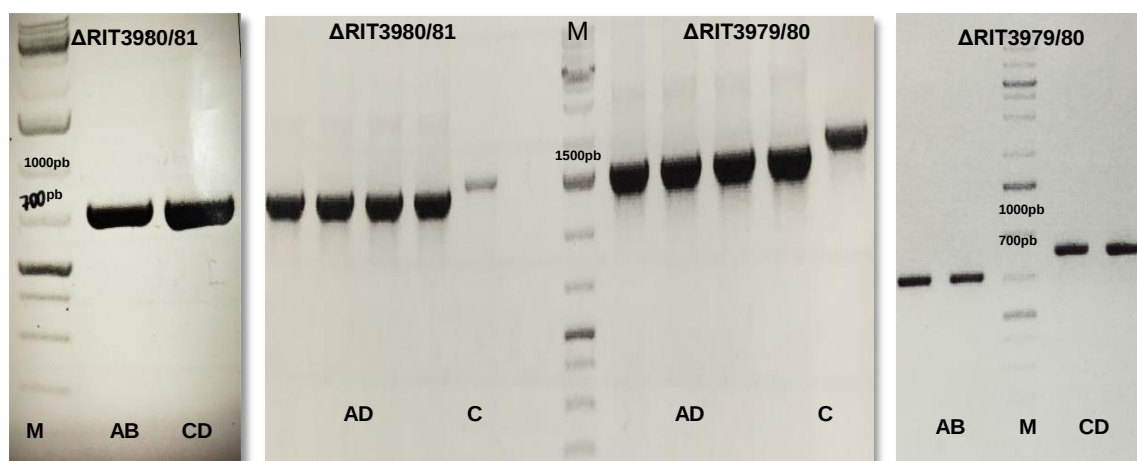


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos resultantes das PCRs primárias (**AB** e **CD**) e de ligação (**AD**) para os mutantes Δ RIT3980/81 e Δ RIT3979/80, onde o tamanho do fragmento AD corresponde ao gene já deletado e C é o tamanho dos genes sem a deleção. M – Padrão de peso molecular (*GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder*, Fermentas). Δ RIT3980/81 – **AB**: fragmento AB (690 pb), **CD**: fragmento CD (686 pb) e **AD**: fragmento AD (1377 pb). Δ RIT3979/80 - **AB**: fragmento AB (682 pb), **CD**: fragmento CD (824 pb) e **AD**: fragmento AD (1506 pb).

Os DNAs genômicos dos mutantes Δ XAC3982, Δ RIP3980/81, Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81 foram amplificados com os oligonucleotídeos específicos para Xac 306 (Xac01 e Xac02) e apresentaram fragmentos com o tamanho esperado (581

pb), semelhante ao fragmento amplificado a partir da estirpe selvagem (Figura 8). Estes resultados confirmaram que as mutações ocorreram na bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

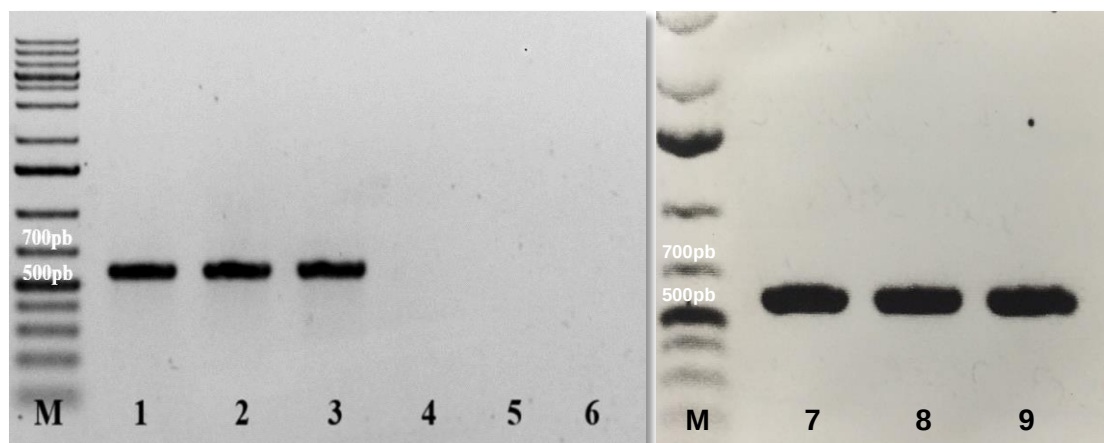


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos resultantes da reação de PCR com os oligonucleotídeos Xac01 e Xac02 (específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.) com os DNAs genômicos dos mutantes Δ XAC3982 (1) e Δ RIP3980/81 (2), da Xac 306 (3 e 9) como controles positivos, com os DNAs de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* estirpe B (XauB) (4), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*, estirpe C (XauC) (5) e água (6) como controles negativos da reação, (7) DNA genômico do mutante Δ RIT3979/80 e (8) DNA genômico do mutante Δ RIT3980/81. M – Padrão de peso molecular (GeneRuler™ 1Kb Plus DNA ladder, Fermentas).

4.2 O gene *htrA* é transcrito em um único RNA mensageiro juntamente com os genes XAC3981, XAC3982 e XAC3983

A reação de PCR utilizando o cDNA da Xac 306 selvagem infectante (inoculada em planta) e os oligonucleotídeos XAC3981 F e XAC3983 R amplificou um fragmento de 1.241 pares de bases (pb) (Figura 9, A1), que corresponde a região dos genes XAC3981, XAC3982 e XAC3983 sendo transcritas conjuntamente. Esse transcrito foi amplificado, pois num primeiro momento acreditava-se que o operon era composto apenas pelos três genes hipotéticos. Entretanto, ao utilizar esse mesmo cDNA para uma reação com os oligonucleotídeos XAC3980 F e XAC3983 R obteve-se a amplificação de um fragmento de 2.795 pb (Figura 9, C1). O tamanho desse fragmento corresponde à somatória dos 1.437 pb do gene *htrA* juntamente com os 1.241pb

correspondente aos três genes hipotéticos citados (XAC3981 a 3983), mais 116 pb referentes à região intergênica entre o gene *htrA* e ao gene XAC3981. Esse resultado corrobora a hipótese de que o gene *htrA* também é transcrito nesse RNAm e, portanto, compõe esse operon. Assim, esse conjunto de genes foi demonstrado pela primeira vez, neste trabalho, como estando presente em um único operon (operon *htrA*-XAC3983).

O cDNA de Xac 306 selvagem infectante foi também utilizado para amplificar cada um dos genes hipotéticos [XAC3981 (363 pb), XAC3982 (486 pb) e XAC3983 (393 pb)] e o gene *htrA* (XAC3980, 1.437pb) individualmente (Figura 6 A2, A3, A4 e B1, respectivamente), utilizando os oligonucleotídeos específicos para cada região: XAC3981 F e R, XAC3982 F e R, XAC3983 F e R e XAC3980 F e R (Tabela 1). Os mesmos resultados foram obtidos quando foram feitas reações de PCR usando como molde o cDNA da Xac 306 selvagem em estado não infectante (meio de cultura NB) (dados não mostrados).

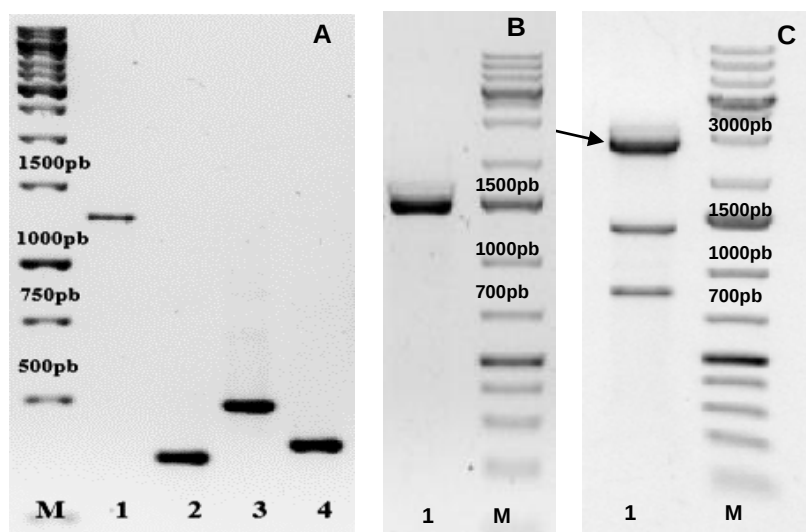


Figura 9. Géis de agarose 1% após corrida eletroforética. Fragmentos resultantes das reações de PCR a partir de transcritos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 em estado infectante. (A1) Fragmento resultante da PCR com os oligonucleotídeos XAC3981 F e XAC3983 R com 1.241 pb. “Amplicon” das ORFs: (A2) XAC3981 com 363 pb, (A3) XAC3982 com 486 pb, (A4) XAC3983 com 393pb e (B1) do gene *htrA* com 1.437pb, amplificados individualmente com os oligonucleotídeos F e R de cada gene e já descritos na Tabela 2. (C1) A seta indica o fragmento de 2795 pb resultante da PCR com os oligonucleotídeos XAC3980-F e XAC3983-R, mostrando que as quatro ORFs são transcritas conjuntamente. M – Padrão de peso molecular *GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder*, Fermentas.

O sequenciamento do transcrito amplificado pelos quatro genes contribuiu para confirmar a correta transcrição desse RNAm policistrônico. Foram confirmadas por sequenciamento, tanto a transcrição para o transcrito com o gene *htrA*, como para o transcrito sem esse gene (apenas com os três genes hipotéticos). As sequências provenientes da reação de sequenciamento estão disponíveis no Apêndice A.

As PCRs realizadas com o cDNA obtido a partir dos mutantes inoculados em laranja ‘Pêra Rio’ e os oligonucleotídeos XAC3981 F e XAC3983 R mostraram que um dos transcritos referente ao operon XAC3980-3983 apresentou alteração de tamanho. O mutante Δ XAC3982 apresentou um transcrito para a região do operon de aproximadamente 800 pb, enquanto que os mutantes Δ RIP3980/81, Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81 apresentaram um transcrito igual ao tamanho do operon da Xac selvagem com 1.241 pb (Figura 10). Esse resultado era esperado para o mutante Δ XAC3982, já que o mesmo possui 80% do gene deletado, enquanto os outros mutantes possuem deleções em regiões anteriores ao que foi amplificado com esses oligonucleotídeos. Desta forma, quando utilizado esse par de oligonucleotídeos, esperava-se um fragmento com o tamanho de 1.241 pb para os demais mutantes, como foi observado na Figura 10 (B).

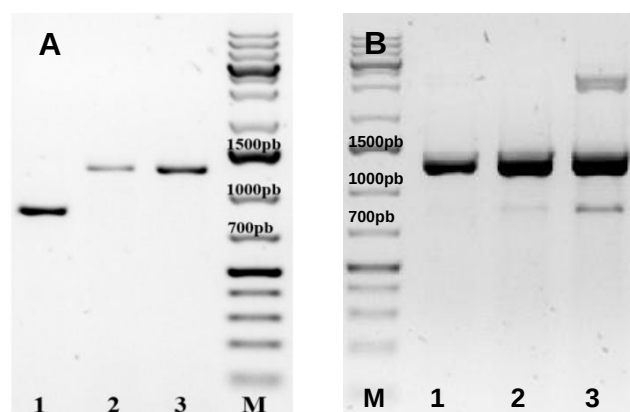


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% para os fragmentos resultantes das reações de PCR utilizando cDNA dos mutantes infectantes e oligonucleotídeos XAC3981 F e XAC3983 R. (A1) Δ XAC3982 com a 834pb, (A2) Δ RIP3980/81, (B1) Δ RIT3979/80 (B2) Δ RIT3980/81 e (A3 e B3) Xac 306 com 1.241pb. M – Padrão de peso molecular *GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder*, Fermentas.

Os oligonucleotídeos XAC3980 F e XAC3983 R foram utilizados em uma reação de PCR onde o cDNA de cada um dos mutantes produzidos para a região promotora foi usado como molde na reação. O resultado foram fragmentos com tamanhos muito parecidos em relação aos apresentados pela Xac 306 e pelo mutante Δ RIT3979/80, já que o mutante Δ RIT3980/81 tem uma deleção de 116 pb entre o gene *htrA* e a ORF XAC3981, tamanho que foi pouco perceptível no gel (Figura 11).

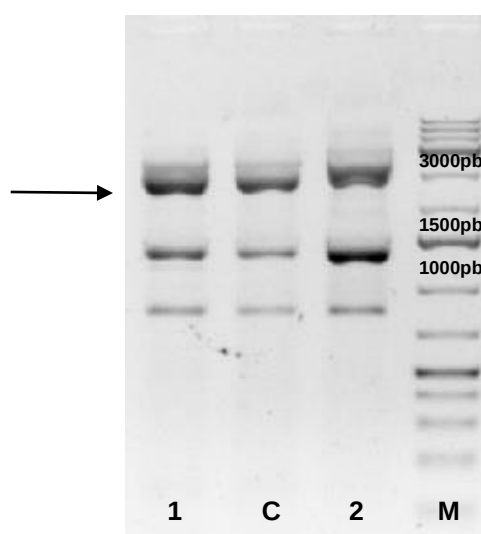


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% para os produtos resultantes da PCR com os oligonucleotídeos XAC3980 F e XAC3983 R a partir de transcritos dos mutantes (1) Δ RIT3979/80, (2) Δ RIT3980/81 e (C) da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 em estado infectante usado como controle. M – Padrão de peso molecular “GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder”, Fermentas. A seta indica tamanho do amplicon esperado, referente ao transcrito desde o gene *htrA* até a ORF XAC3983, compreendendo 2.795 pb.

O fragmento resultante da reação de PCR onde se observou um transcrito com o tamanho referente aos quatro genes preditos para o operon XAC3980-3983 foi recortado do gel, purificado e utilizado na reação de sequenciamento com os oligonucleotídeos reversos de cada gene do operon, assim como com o oligonucleotídeo direto do gene *htrA* (XAC3980 F) (Tabela 2).

As reações de sequenciamento foram analisadas com a ferramenta Blastn (“National Center for Biotechnology Information”- NCBI), onde foram alinhadas uma a uma em contraste à sequência do operon XAC3980-3983. Essa

comparação confirmou que esse fragmento é proveniente de um único RNAm, já que nele foram transcritos os quatro genes (Figura 12).

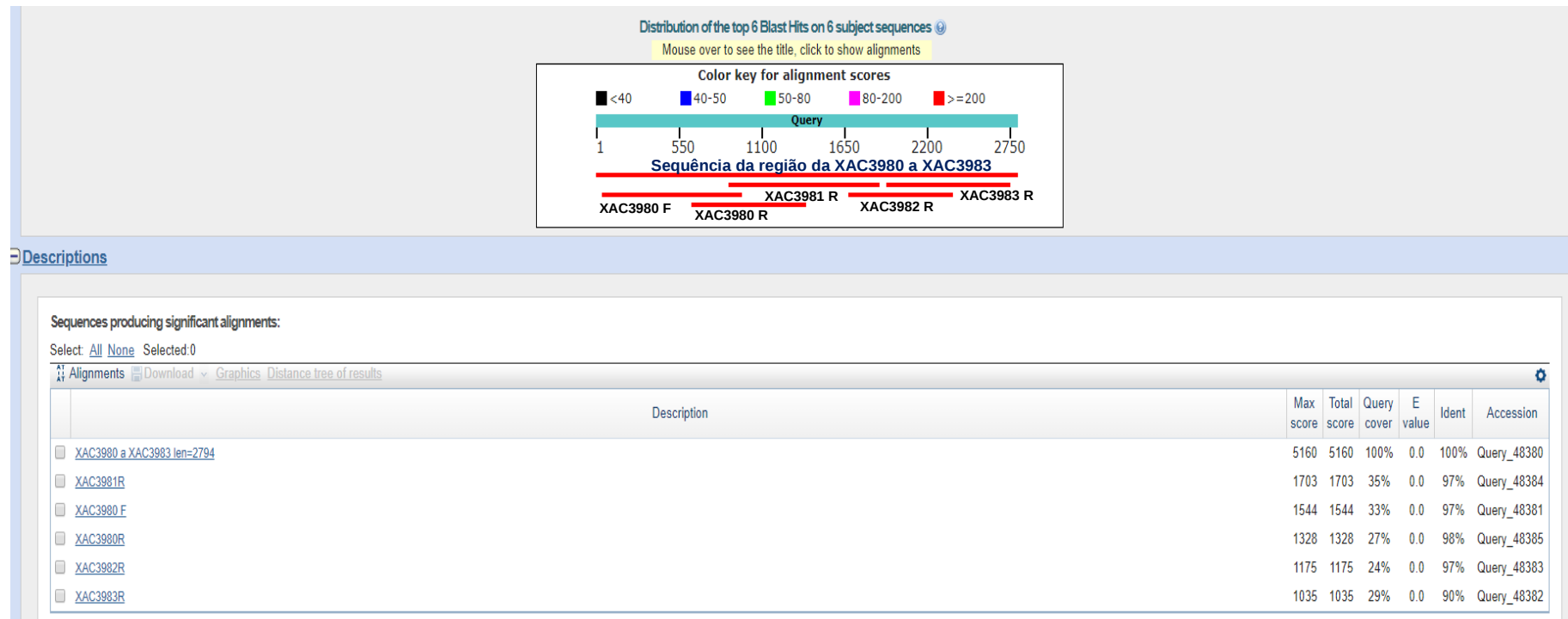


Figura 12. BLASTn do alinhamento da sequência de nucleotídeos do operon *htrA*-XAC3983 contrastada com os “amplicons” resultantes da reação do sequenciamento. Cada traço vermelho corresponde a uma região sequenciada com seu respectivo oligonucleotídeo específico, identificado em preto e localizado abaixo de cada uma. Da esquerda para à direita: **XAC3980 F**, fragmento sequenciado com oligonucleotídeo direto do gene *htrA*; **XAC3980 R**: fragmento sequenciado com oligonucleotídeo reverso do gene *htrA*; **XAC3981 R**: fragmento sequenciado com oligonucleotídeo reverso do gene XAC3981; **XAC3982 R**: fragmento sequenciado com oligonucleotídeo reverso do gene XAC3982; **XAC3983 R**: fragmento sequenciado com oligonucleotídeo reverso do gene XAC3983. No quadro seguinte, em azul, nomeado como “Descriptions” estão identificados novamente cada oligonucleotídeo, assim como o percentual de identidade de cada sequência em relação à sequência contrastada (XAC3980-XAC3983).

Segundo as ferramentas DOOR (Mao et al., 2014) e ProOpDB (Taboada et al., 2011), o operon discutido neste estudo é composto pelos genes XAC3981, XAC3982 e XAC3983 e abaixo estão descritas as espécies de bactérias da família Xanthomonadaceae que possuem operons conservados idênticos ao da Xac 306 (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição dos operons classificados como idênticos ao operon XAC3981/3983 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306, descrita na tabela como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306.

Operon ID	Número de genes	Espécies	NC
58758	3	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913	NC_003902
62861	3	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	NC_003919
448483	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	NC_010943
457400	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	NC_011071
650290	3	<i>Xanthomonas albilineans</i> GPE PC73	NC_013722
793663	3	<i>Pseudoxanthomonas suwonensis</i> 11-1	NC_014924
1198227	3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> JV3	NC_015947

(Operon ID): número de referência para esse operon no banco de dados DOOR; (NC): código referente à sequência genômica disponível no NCBI.

Esse operon foi anteriormente citado por Moreira e colaboradores (2017), onde realizaram uma análise filogenética e descreveram que as proteínas referentes aos três genes hipotéticos, XAC3981, XAC3982 e XAC3983, são organizados em um cluster e conservados na família Xanthomonadaceae (Figura 13).

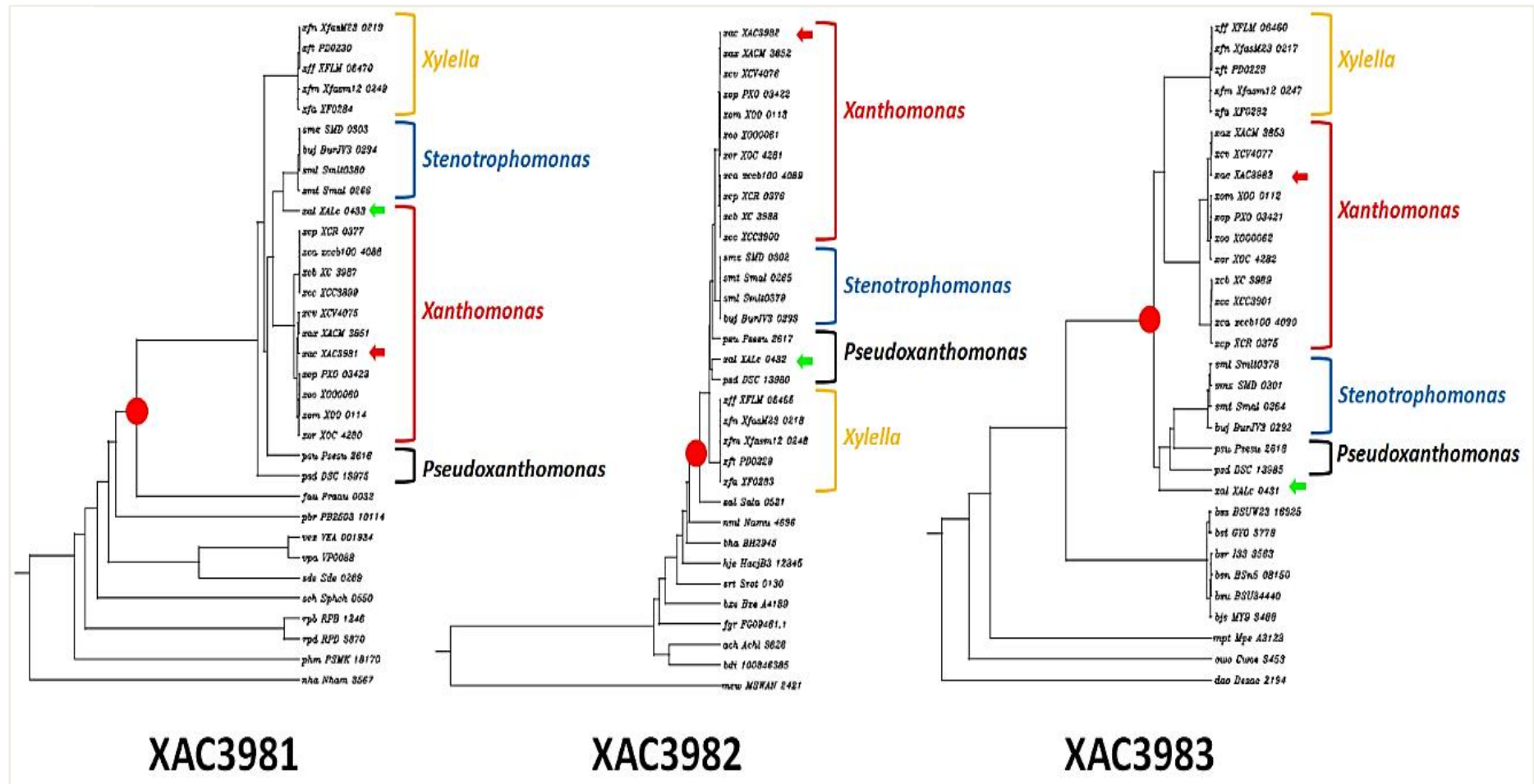


Figura 13. Análise filogenética das proteínas hipotéticas conservadas de *Xanthomonas* relacionadas ao operon *htrA*-XAC3983. As cores destacam os diferentes gêneros pertencentes à família Xanthomonadaceae. O círculo vermelho destaca a separação entre a família Xanthomonadaceae (acima) e outros organismos usados como referência (abaixo). A seta vermelha destaca os respectivos genes de *Xac*, enquanto a seta verde destaca os respectivos genes de *Xanthomonas albilineans* (*Xalb*). Fonte: Moreira et al. (2017).

Elucidar a funcionalidade de genes e proteínas hipotéticas é sempre um desafio, pois além de demandar um tempo maior de investigação a respeito das funções, normalmente não há informações de referência disponíveis para comparação. Uma maneira alternativa de atingir esse objetivo é empregar análises associadas ao domínio, o que poderia ajudar a prever a potencial funcionalidade de proteínas hipotéticas (Wang et al, 2017). O gene XAC3983 é um exemplo de estrutura ainda sem nenhuma descrição na literatura.

Os três genes hipotéticos XAC3981, XAC3982 e XAC3983 não possuem nenhum peptídeo sinal e a estrutura tridimensional destas proteínas não foi possível de ser determinada, já que nenhuma apresentou similaridade com as estruturas proteicas já depositadas para comparação nos bancos de dados para estrutura 3D de proteínas, o PDB “Protein Data Bank” (Berman et al., 2007). Todas foram analisadas com mais de uma ferramenta para a predição de estrutura, entretanto o resultado foi o mesmo em todas as pesquisas.

Diferentemente das ferramentas DOOR e ProOpDB, a “Microbes Online Operon Predictions” (Dehal et al., 2009) prediz que o operon é composto pelo gene *htrA* (XAC3980) e pelos três genes hipotéticos (XAC3981, XAC3982 e XAC3983) da Xac 306 (Figura 14), predição esta que corrobora com os resultados apresentados neste estudo.



Figura 14. Imagem gerada pela ferramenta “Microbes Online Operon Predictions” mostrando o operon *htrA*-XAC3983 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306. Em azul estão os genes próximos preditos como pertencentes ao mesmo operon. Os números abaixo dos genes indicam a distância intergênica entre dois genes adjacentes. O número negativo -4 indica que os genes XAC3982 e XAC3983 são sobrepostos em quatro nucleotídeos. Os genes a montante e a jusante do operon são mostrados em branco.

Com essa mesma ferramenta foi gerada uma matriz de correlação gênica a partir de dados já depositados neste servidor, a qual mostrou que os quatro genes presentes no operon *htrA*-XAC3983 possuem um mesmo perfil de expressão, com valores de coeficiente de correlação de Pearson muito próximos. Essa correlação é chamada positiva (valores muito próximos de 1) e significa que

quando foram comparados aos pares, sempre possuem valores de expressão aumentada ao mesmo tempo (Figueiredo Filho e Silva Junior, 2009). Entretanto, quando comparados com um dos genes adjacentes e que não compõe o operon, XAC3984, esse nível de expressão apresenta valores inversos. Esses dados corroboram a hipótese de que deve existir uma regulação conjunta para estes quatro genes presentes no operon *htrA*-XAC3983 (Figura 15).

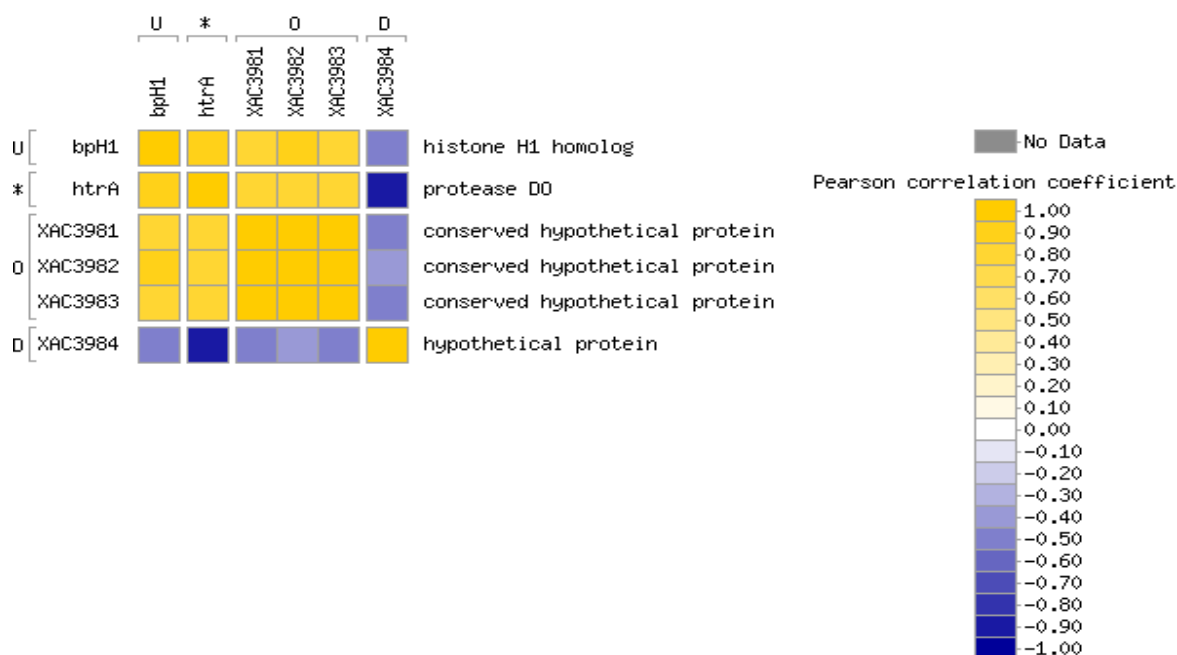


Figura 15. Imagem gerada pela ferramenta “Microbes Online Operon Predictions” mostrando o heatmap entre os genes que compreendem o operon XAC3980-3983. As abreviações da coluna do gene do heatmap e do grupo de linhas correspondem a: **U**: primeiro gene a montante do operon, *****: gene selecionado, **O**: genes no operon, tanto a montante como a jusante do gene selecionado, **D**: primeiro gene a jusante do operon.

O gene *htrA* de *Xac* possui similaridade com o gene de *Xylela fastidiosa* que codifica para uma proteína pertence à família das serino proteases HtrA, que são altamente expressas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As HtrA procarióticas são atribuídas à tolerância contra várias tensões de dobramento, bem como à patogenicidade (Wessler et al., 2017). Elas possuem características de virulência as quais podem ser atribuídas à redução da aptidão das bactérias, maior susceptibilidade ao estresse ambiental assim como à diminuição da secreção de fatores de virulência. Em alguns patógenos Gram-negativos e Gram-positivos, a própria HtrA pode ser exposta ao ambiente extracelular promovendo

a colonização bacteriana e a invasão dos tecidos do hospedeiro (Backert et al., 2018).

Diante desses resultados de transcritos únicos desde o gene *htrA* até o gene XAC3983, iniciou-se a busca *in silico* por promotores existentes a montante do predito operon XAC3981-3983 (desde o início do gene *htrA* - XAC3980, até o final do gene XAC3983), bem como a montante do operon *htrA*-XAC3983 (desde o início do gene *bpH1* -XAC3979 até o final do gene XAC3983). As análises *in silico* do predito operon XAC3981-3983 localizou duas regiões promotoras. Um promotor está situado no meio do gene *htrA* (XAC3980) e o outro inicia nas quatro últimas bases do mesmo gene e continua imediatamente a jusante. Foi predito também um sítio de ligação para o fator de transcrição no final dessa segunda região promotora. A Figura 16 ilustra a localização das duas regiões promotoras.

4673409>
 ATGCGACCGCTGCCCTACCGTGCCTGACTCTTTCGCTGGCCGCTGCCTTCGGCGGCTTTGCCGCCACCGGCATCAACGCCTGGCTCGACA
 ATCGCGCCGAAGCCACACCCCCAGCAACGCCGCTTTACCGTGGCGACGGCCGCCGATTGCCGGCGGCGGTGGCCGCCAACCTGT
 GCCGTGCTGGCGCCGATGCTGCAGCAGGCCATGCCCGCGGTGGTGAGCGTGAACACCAAACAGGTGGTGCGGCTCCGCAACCCGTTT
 TTCAACGACCCGATCCTGCGCCGCTGTTTCCGCGAGGTGCCGAGGACCGCATCAACGAGTCGCTGGGTTCGGGCGTGATCATCGATG
 CGCAAAAAGGGTATGTGCTGACCAATCACCACGTATCGAAAACGCCGACGACGTGCAGGTGACGCTCGGCGACGGACGCACGGTCAA
 GGCCGAGTTCATCGGCTCCGATGCCGATACCGATATTCGCTGATCCGCTCAAGGCCGACAACTCACCATATCAAATCGCCGAC
 AGCAACGCGCTACGCGTGGGCGATTTTGTGGTGGCCATCGGCAACCCGTTTCGGCTTACCCAGACCGTCACCTCCGGCATCGTCTCGG
 CAGTGGGCGCGCAGCGGGATTCGCGGCTTGGGCTACCAGAATTTCATCCAGACCGATGCCTCGATCAACCCCGGCAACTCGGCGGCGC
 GCTGGTCAACCTGCAAGGCCAGTTGGTGGCATCAACACGCCAGC**TTCAATCCGCGAGGGCAGCATGGCCGGCAATAT**CGGCCCTGGGG
 CTGGCGATTCGGTCCCAACTGGCGCGCAATGTGCTCGAGCAATTGGTGACCAAGGGCGTGGTGGTGGCGGCGACGCTCGGCTGGGAGA
 CCCAGAACCTCACCAACAGATGCTGCAGGGCCTGGGGTGGATTGCTTGC CGCGCGCATTTGGTGACACGGGTGTTGCCGGGCTCCGC
 AGCGGCGCGCGGCGAGCGTGCAACCGGGCGATGTCGTGGTGGCGGCCAACGACGCGGTGGACAGCGCCGAAGCGCTGCACAACCTAC
 GAAGGCCCTGCAGGCGGTTGGCAGTGCGGTGACCCCTGGATATCCGTGCGGATGGCAAGCCGCTCAAATCAAGGCCACGCTGAGAGAG
 AGGACCGCGCCATCACCGCGACATGCTGGACCCGCGTCTGACCGGCGCGACCTTCGTGATCTCCCGGAATCGCTGAGTCGCGG
 CATCACCGGGGTGATGGTGAGCGAGGTCAAACGCGCGGTCGCGCTGCCGCCAACGCGCTGGTGC CGCGCGATGTGATCGTGGCCAGC
 AGCGTGGGCGAGTTCCGCGACCTTGCCAGCTGGCGGGCCAAATTTCCAACGTAACCCGACGAGCTTGTGCTGCTATCTGCGTGGCA
 ACGCGCAGTACGACGCGCTGATGCG**TTGACGCACTGTGTACCCGAAGTTGGTTGCACTAA**CGCCTCCTACACCCCCCGGTGCTATTG
 CTACCGCTCGACCGCATGTGAGTGGCGGCTGCCATCAATACCGGAAGGAGATATCGCATGAGCCCCACCAATACCGATCAGCTGAAGG
 AAAACCTGAGCGAAGCCGCGACCCATCTGAAGTCGGCCGCAAAACGCCGCGCGGAAGCCGTGAGGGGTGCGACCGAGCGCGCGCGCA
 TGAGCTCAAGCTCGGTGCGGCCAACGTCAAGGCCAACTGTCCGACACCGCGCTGGCCGGCATGGCCGCTGCCGAGTTCCGCGGTGCC
 GCTGCCAAGGAGCAGATCGACGTCCTGGTTGCCAAGGGCAACGATCTGCTGGAAAGCGCCACCGATCTGATCCGCGAGCGTCCGCTGG
 CCGCCTTCGGCGTTGCCCTTCGCGCTGGCTGGGTCAATGCCAAGCTGGCACGCGACGCAACGACAATA**AGTCTGTGAGCGATCAGGCCCTC**
 TCCCCGTCGCGGAACCGACGCCAGACGCGCGCGCAAAACGCCAGGACTGGACGAAAGCGTACGTGCGGTTCGGCGCGCGCGCGCGT
 GCCACGCTGGGCTCGGCCAAGGACACAGTCGCGCCTTCGCGCGGCTGGTGTGCGGTGATCTGCAACTGGCACGCGACGCAATTCGGG
 GAGGCCTGGCCTGGGCTGCGTGGCGGTGGTGTTCGGTGCCTCGTCATGGTTATTGCTGGCTGGCGCCATCATCGCCCTGCTGCAGCG
 TGCCGGGCTGTCGTGGTTCCAGGCGATGTTTTTCACTGCGTTGGCGAGTCTGTTGGTGACCGGCATTGCGGCATGGCGTGTGTTCTTC
 TACTTCGACCATACCGGCATGAATGCAACGCGCGCTCAGCTCATCAAGCTTGGGATTTTCGATGACCCCGGCAAGACGATGAGGCGG
 CGACCTCTGCCAGTGGAGCAGTCCATGAAATTTGGAACCTTGCCTCAACGCGTCGAACGCGCCGAATATCTGGTCAAGGACGTGCC
 CAAGAAACGCGCCTGCATTGGAGCGAACTCCGCCAGACCTGGCGTGCCGGGTGGTCCCACTGCGCATTATGACGGTGGGCTTCGGGC
 TGGGGTTTGTACCGGCCGTAATGAACCGCAAGCGCATTTGGGGAGCATCGCCAGCAAGCTTGGCGGTATTCCCAAGCTTCTGCAGAT
 GATCAGACCATCTCCGCGCTGTTCAACGCGCACCGTGCAGGAAGCTTCCGAGCAGGCCGAACGTGCTCGAGACAATGCCGAGGAA
 GTGGCAGCCGACCCGCGGTGACCGTGGTGCAGGTCCCGGCCGATCGCGCCGATCGCGCCGCTGA
 >4676202

Figura 16. Localização dos promotores preditos pela ferramenta BPROM do programa “Softberry”. A área com fundo na cor cinza corresponde ao gene *htrA* (XAC3980). Os nucleotídeos marcados em verde correspondem aos genes XAC3981, XAC3982 e XAC3983; os nucleotídeos marcados em negrito na cor preta correspondem às regiões intergênicas, sendo que XAC3982 e XAC3983 compartilham 4 nucleotídeos; as marcações na cor rosa correspondem aos promotores preditos. A caixa vermelha está delimitando a região predita como sítio de ligação para o fator de transcrição.

Figura 17. Localização dos promotores preditos pela ferramenta BPROM do programa “Softberry”. A área com fundo na cor cinza corresponde ao gene *htrA* (XAC3980). Os nucleotídeos marcados em verde correspondem aos genes XAC3981, XAC3982 e XAC3983; os nucleotídeos marcados em rosa correspondem ao gene *bpH1*(XAC3979) e em negrito na cor preta correspondem às regiões intergênicas, sendo que XAC3982 e XAC3983 compartilham 4 nucleotídeos. A região demarcada em azul corresponde ao promotor predito.

4.3 As mutações das regiões intergênicas a montante dos operons XAC3981-3983 e *htrA*-XAC3983 são apolares

Construções moleculares utilizadas para a deleção de genes devem alterar somente o gene correspondente a deleção, sendo que os genes posteriores e anteriores devem se manter inalterados e sem modificações, esse tipo de mutação é chamada de apolar (Jácomo, 2014).

O cDNA dos mutantes Δ RIT3980/81 e Δ RIT3979/80 em estado infectante (5 DAI) foram utilizados como molde para reações de PCR com os oligonucleotídeos específicos que amplificam os genes a montante (*bpH1* - XAC3979 com 852pb) e a jusante (gene XAC3984 com 345 pb) ao operon *htrA*-XAC3983 (Tabela 4), e verificou-se que a deleção da região intergênica não altera a transcrição dos mesmos. Assim, os dois mutantes produzidos pela deleção da região intergênica podem ser classificados como apolares, já que em nenhuma das situações ocorreu alteração na transcrição dos genes a montante ou a jusante (Figura 18).

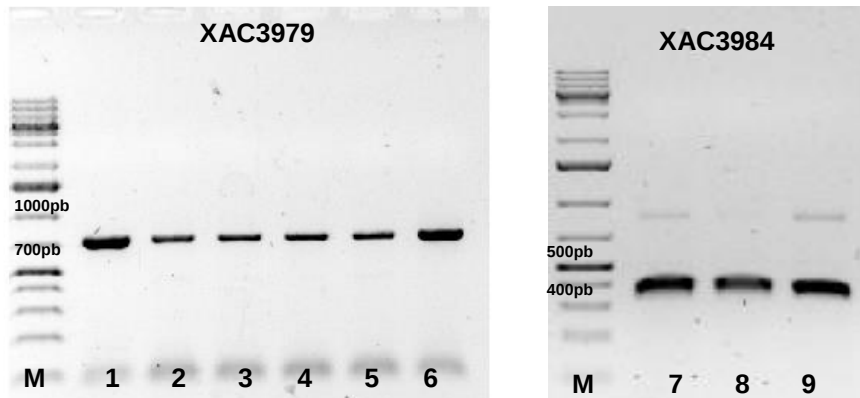


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% para os produtos resultantes da PCR com os oligonucleotídeos que amplificam o gene *bpH1* (XAC3979) e ao gene XAC3984. (1) fragmento amplificado usando como molde o DNA genômico de XAC 306 selvagem, (2, 3, 4 e 5) fragmentos amplificados usando como molde o cDNA do mutante Δ RIT3979/80 cultivado em NB, (6 e 7): controles positivos usando o cDNA de XAC 306 selvagem cultivada em NB (6) e em estado infectante (7) como molde para a amplificação, (8 e 9) fragmentos amplificados usando como molde o cDNA em estado infectante do Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81, respectivamente. M – Padrão de peso molecular *GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder*, Fermentas.

Uma reação de PCR com os oligonucleotídeos que amplificam o gene *htrA* também foi feita usando como molde o cDNA dos mutantes Δ RIT3980/81 e Δ RIT3979/80 em estado infectante (5 DAI e cultivado em NB). O mutante Δ RIT3980/81 não afetou a transcrição do gene *htrA* e, portanto, também foi classificado como apolar (Figura 19).

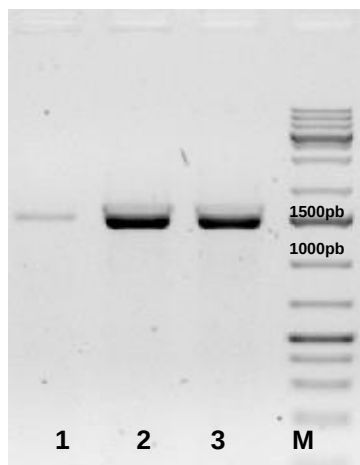


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose 1% para os produtos resultantes da PCR com os oligonucleotídeos que amplificam o gene *htrA* em um fragmento com 1437 pb (XAC3980). (1) fragmento amplificado usando como molde o cDNA do mutante Δ RIT3979/80 em estado infectante, (2) fragmento amplificado usando como molde o cDNA do mutante Δ RIT3980/81 em estado infectante, (3) controle positivo usando o cDNA de XAC 306 selvagem cultivada em NB. M – Padrão de peso molecular “GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder”, Fermentas.

Para confirmar que a mutação da região intergênica parcial (Δ RIP3980/81) do operon XAC3981-3983 não afetou a transcrição do gene XAC3981, foi realizada uma PCR com o cDNA do mutante Δ RIP3980/81 inoculado em meio de cultura NB, e em estado infectante (5 DAI), e como controle positivo para a reação foram utilizados o cDNA da Xac 306 nas mesmas condições que o mutante (NB e 5 DAI) e o DNA genômico de Xac. O Δ RIP3980/81 também foi classificado como um mutante apolar, pois não afetou a transcrição do gene XAC3981 (Figura 20).

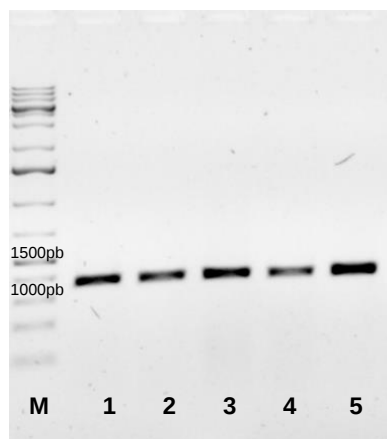


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 1% para os produtos resultantes da PCR com os oligonucleotídeos que amplificam 1242 pb referente ao gene XAC3981. Fragmentos amplificados usando como molde o cDNA do mutante Δ RIP3980/81(1) cultivado em NB e (2) em estado infectante; fragmentos amplificados usando o (3) cDNA de Xac 306 selvagem cultivada em NB e (4) em estado infectante e (5) fragmento amplificado usando como molde o DNA genômico de Xac 306 selvagem. **M** – Padrão de peso molecular “GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder”, Fermentas.

Resultados da literatura mostraram que dois genes do novo operon XAC3980-3983, quando interrompidos pela inserção do transposon Tn5, alteram a virulência de Xac, o gene *htrA* (Laia et al., 2009) e o gene XAC3981 (Moreira et al., 2017). No entanto, não há evidências se essas mutações foram ou não polares, já que os autores não avaliaram esse efeito em cada uma das situações ou fizeram a complementação da mutação. Diante deste novo contexto, ou seja, da existência de um novo operon constituído pelos genes *htrA* (XAC3980), XAC3981, XAC3982 e XAC3983 (hipotéticos), iniciou-se a busca em obter mutantes das regiões promotoras existentes a montante do operon *htrA*-XAC3983 para averiguar o efeito da deleção na expressão desse operon.

4.4 Teste de patogenicidade para os mutantes Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81

Os mutantes Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81, quando inoculados em folhas de tangerina ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata*) (A) e laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* Osbeck) (B), não apresentaram alteração de fenótipo em relação a estirpe selvagem (Figura 21).

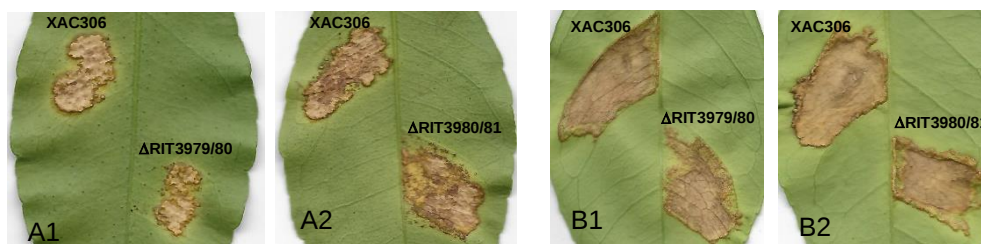


Figura 21. Teste de patogenicidade dos mutantes Δ RIT3979/80 e Δ RIT3980/81 em folhas de 'Ponkan' (*Citrus reticulata*) (A), laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* Osbeck) (B) na concentração de 10^6 UFC/mL pelo método de infiltração por pressão. As imagens mostram os sintomas na face abaxial das folhas para o mutante Δ RIT3979/80 (A1 e B1) e Δ RIT3980/81 (A2 e B2) ambos inoculados à direita, enquanto a Xac 306 foi inoculada à esquerda da nervura central. Os sintomas foram avaliados 30 dias após a inoculação.

Da mesma forma, a deleção dessas regiões parece não ter alterado a transcrição do operon XAC3981-3983, assim como para o operon *htrA*-XAC3983 (Figuras 10 e 11).

Diversas bactérias fitopatogênicas produzem polissacarídeos extracelulares que contribuem para a capacidade desses organismos causarem doença (Denny, 1995). Uma destas, a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, é o agente causal da podridão negra das crucíferas e produz um polissacarídeo extracelular denominado xantana. O operon gum é composto por 12 genes, *gumB* a *gumM*, cujos produtos estão envolvidos na biossíntese de xantana e são regulados por um promotor situado a montante do gene *gumB* (Vojnov et al., 2001), embora existam relatos que essa bactéria possui promotores fracos a montante de *gumK* e *gumD* (Katzen et al., 1996, Vojnov et al., 2001) e que afetam a transcrição deste operon (Rigano et al., 2007).

Uma hipótese para os resultados aqui apresentados é que esta região predita como promotora não seja a única responsável pela transcrição do operon, e talvez exista outro promotor que possa atuar controlando a transcrição deste operon juntamente com este promotor deletado. Se existe outro promotor, é possível que este também precisasse ser interrompido para que a transcrição fosse completamente interrompida. Ou ainda, que esta região predita como promotora, talvez não desempenhe esta função para o operon em questão.

4.5 Experimentos realizados com os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81

4.5.1 Teste de patogenicidade em laranja doce 'Hamlin' (*Citrus sinensis* Osbek), tangerina 'Ponkan' (*Citrus reticulata*) e Citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.)

O mutante Δ XAC3982, quando inoculado na concentração de 10^6 UFC/ml pelo método de perfuração, causou uma diminuição de necrose, que se restringiu apenas ao local da infiltração do inóculo, e do halo clorótico em folhas de tangerina 'Ponkan' quando comparado com a estirpe selvagem Xac 306 (Figura 22, A2). É possível verificar também uma diminuição da área necrosada em folhas de laranja doce 'Hamlin' e em Citrumelo 'Swingle' ao compararmos o mutante Δ XAC3982 com a estirpe selvagem de Xac, inoculados pelo método de infiltração na concentração de 10^6 UFC/ml (Figura 22, B1 e C1), indicando dificuldade do mutante em se desenvolver no lóbulo foliar por completo. Já o mutante Δ RIP3980/81, ao ser inoculado em folhas de tangerina 'Ponkan' (Figura 23A), de laranjeira 'Hamlin' (Figura 23B) e Citrumelo 'Swingle' (Figura 23C) por infiltração (Figura 23 A1, B1 e C1) ou perfuração (Figura 23 A2, B2 e C2), não apresentou alteração de fenótipo em comparação com a Xac selvagem. Quando as suspensões bacterianas foram pulverizadas sobre folhas jovens de laranjeira, todas as estirpes (Xac 306, Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81) apresentaram virulência semelhantes (Figura 24).

Segundo a base de dados de proteínas UniProt (The UniProt Consortium, 2019), a sequência da proteína hipotética referente ao mutante Δ XAC3982 possui homologia com proteínas que apresentam 98,1% de identidade com uma família de proteínas fago holina de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* str. CIO151, e também com proteínas de membrana de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (estirpe 85-10), assim como com outras várias proteínas hipotéticas.

As holinas são um grupo de proteínas de membrana codificadas por fagos que controlam o acesso de endolisinas ao peptidoglicano e, desse modo, desencadeiam o processo de lise num momento preciso (Shi et al., 2012). São xenólogos de origem fágica presentes em praticamente todas as bactérias (Desvaux, 2012). Os fagos lisam a célula hospedeira a partir do seu interior,

geralmente usando o sistema holina-endolisina, onde as holinas causam poros na membrana celular, permitindo que as endolisinas tenham acesso ao peptidoglicano, sobre o qual exercem atividade catalítica (Azeredo, 2013).

As proteínas holinas são codificadas dentro dos genomas de bacteriófagos, onde promovem a lise celular para a liberação do vírion, e dentro dos genomas bacterianos, onde elas servem a uma diversidade de funções potenciais ou estabelecidas, que incluem a liberação de agentes de transferência gênica, a facilitação de eventos de diferenciação como a esporulação e germinação de esporos, contribuição para a formação de biofilme, promoção de respostas a condições de estresse e a liberação de toxinas e outras proteínas (Reddy e Saier, 2015).

Se a proteína codificada pelo gene XAC3982 for realmente uma holina e estas proteínas holinas contribuírem para a formação de biofilme em Xac, assim como em bacteriófagos, a interrupção desta proteína no mutante Δ XAC3982 poderia explicar a menor formação e expansão das lesões no tecido vegetal, já que a formação de biofilme é um processo importante para o estabelecimento desta bactéria e foi interrompido. Entretanto, os testes realizados para esse mutante não confirmaram tais expectativas.

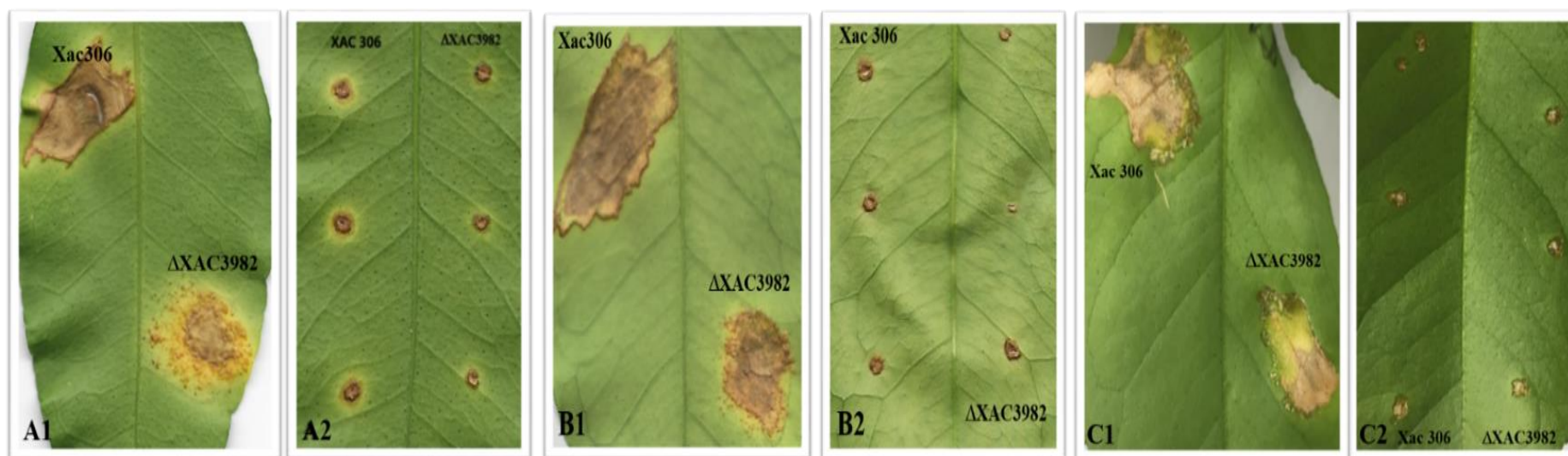


Figura 22. Teste de patogenicidade com o mutante Δ XAC3982 e com a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 em folhas de (A) tangerina ‘Ponkan’ (*Citrus reticulata*), (B) laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* Osbeck) e (C) citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) na concentração de 10^6 UFC/mL. O Mutante Δ XAC3982 foi inoculado a direita da nervura central na face abaxial da folha pelo método de infiltração por pressão (A1, B1 e C1) e perfuração do limbo foliar com agulha (A2, B2 e C2). A *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 foi inoculada à esquerda da nervura central nas duas metodologias utilizadas. Os sintomas foram avaliados 30 e 60 dias após a inoculação por infiltração e perfuração, respectivamente.

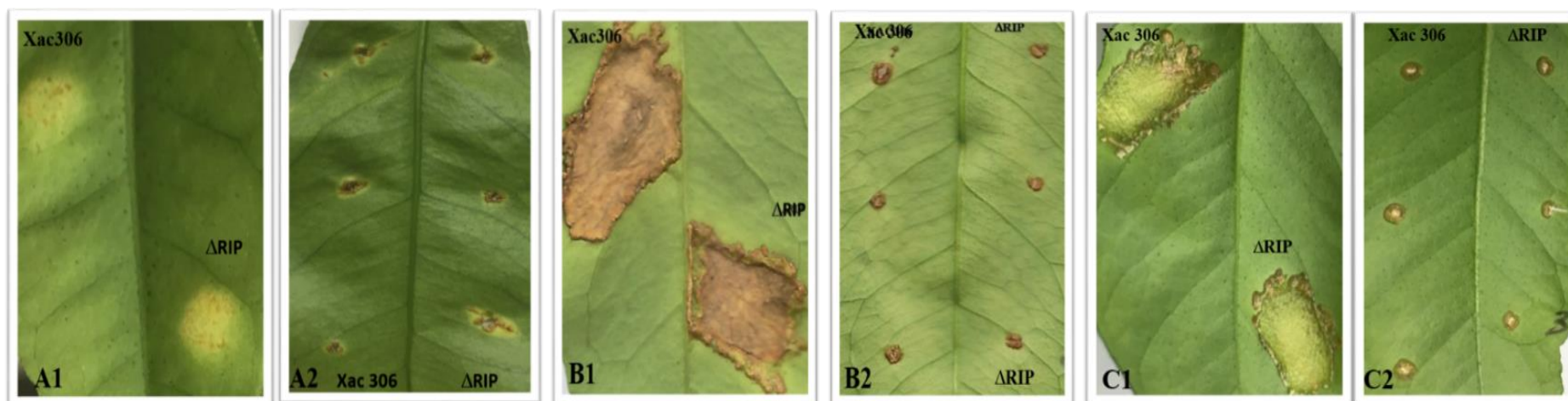


Figura 23. Teste de patogenicidade com o mutante $\Delta RIP3980/81$ e com a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe Xac 306 em folhas de (A) tangerina 'Ponkan' (*Citrus reticulata*), (B) laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* Osbeck) e (C) citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) na concentração de 10^6 UFC/mL. O Mutante $\Delta RIP3980/81$ foi inoculado a direita da nervura central na face abaxial da folha pelo método de infiltração por pressão (A1, B1 e C1) e perfuração do limbo foliar com agulha (A2, B2 e C2). A Xac 306 foi inoculada à esquerda da nervura central nas duas metodologias utilizadas. Os sintomas foram avaliados 30 e 60 dias após a inoculação por infiltração e perfuração, respectivamente.

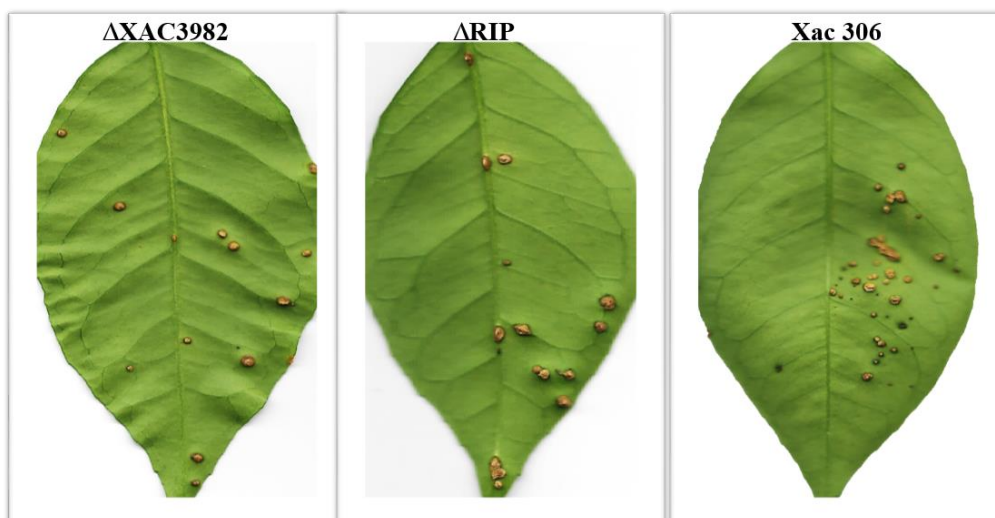


Figura 24. Teste de patogenicidade por pulverização em folhas de laranja ‘Hamlin’ (*Citrus sinensis* Osbek) com as suspensões bacterianas da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 e dos mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81 na concentração de 10^8 UFC/ml, com sintomas avaliados 30 dias após a inoculação.

Os resultados obtidos pela avaliação da patogenicidade por pulverização sugerem que as mutações desses genes não afetaram a capacidade de penetração das bactérias através das aberturas naturais das plantas.

Com este resultado, podemos inferir que a sequência de 58 pares de bases a jusante do gene *htrA* (XAC3980), na qual foi localizado um predito RBS (sítio de ligação dos ribossomos) pela ferramenta BPROM, não interferiu na transcrição do gene XAC3981, pois o Δ RIT3980/81 não apresentou alteração na virulência quando comparado com estirpe selvagem de *Xac in planta* (Figura 21). Da mesma forma, os resultados apresentados aqui para o Δ RIP3980/81, confirmam que essa mutação foi apolar, ou seja, não afetou a transcrição do gene XAC3981, e nesse contexto, não houve alteração de virulência quando analisado *in planta*. Por outro lado, o mutante para o gene XAC3981 obtido por inserção do transposon Tn5 (Laia et al., 2009), quando analisado *in planta*, levou a uma redução quase que completa do fenótipo em comparação com a Xac 306. Cabe aqui discutir a respeito desse mutante obtido por inserção do transposon, pois não há relatos do local exato onde este transposon foi inserido, nem mesmo se resultou numa mutação polar ou apolar. Com isto, abre-se a possibilidade de supor que esta mutação pode ter alterado outras regiões adjacentes ao gene XAC3981, ou até mesmo alterado a transcrição de todo o operon. Se a

interrupção feita pelo transposon resultou em uma mutação polar, por exemplo, muito provavelmente os sintomas *in planta* provocado por este mutante deveriam ser bem mais atenuado quando comparado com a bactéria selvagem.

4.5.2 Curva de crescimento bacteriano *in planta*

A curva de crescimento bacteriano realizada em folhas de laranja 'Hamlin' em oito tempos de coleta mostrou que os mutantes contendo deleção parcial na região intergênica a montante do gene XAC3981, bem como no gene XAC3982 se multiplicaram no interior do hospedeiro da mesma forma que a estirpe selvagem. Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que essas mutações não reduziram a capacidade de multiplicação bacteriana *in planta* (Figura 25).

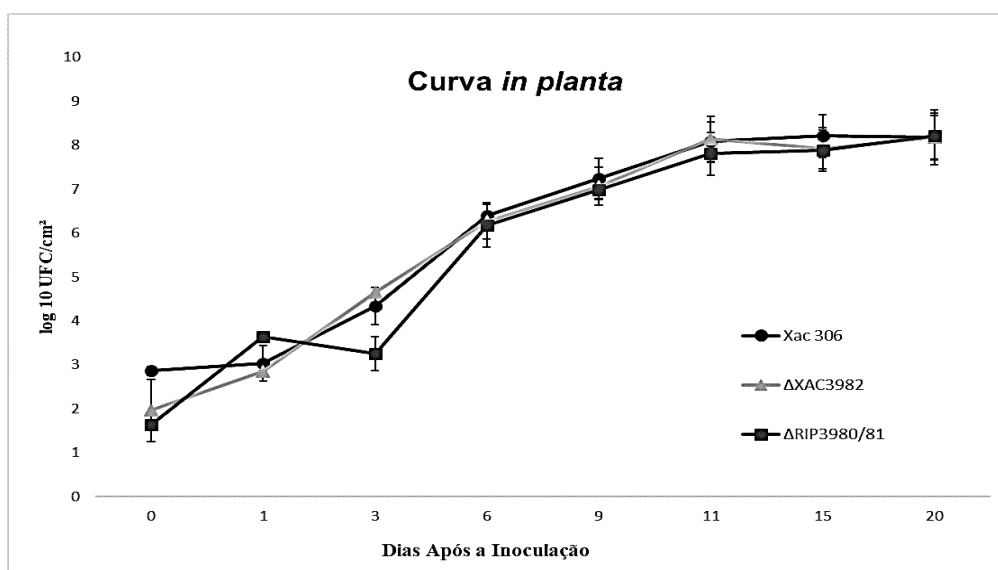


Figura 25. Curva de crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 e dos mutantes ΔXAC3982, ΔRIP3980/81 em folhas de laranja 'Hamlin' (*Citrus sinensis* Osbek) aos 0, 1, 3, 6, 9, 11, 15 e 20 DAI (dia após inoculação), gerada com base na contagem de colônias. As barras representam os desvios padrões das amostras.

4.5.3 Reação de Hipersensibilidade em pimenta

Os sintomas de reação de hipersensibilidade (HR) em pimenta [*Capsicum baccatum* var. *praetermissum* (Heiser & P. G. Smith) Hunz] foram observados durante 10 dias. Os mutantes ΔXAC3982 e ΔRIP3980/81 apresentaram sintomas

característicos de HR (resposta de hipersensibilidade), semelhantes aos sintomas apresentados pela Xac 306 selvagem (Figura 26).

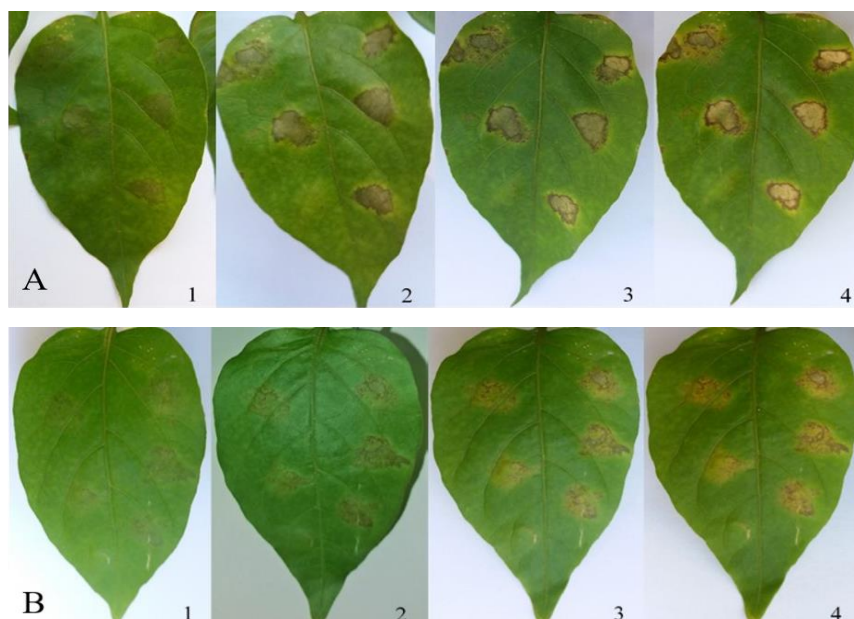


Figura 26. Fenótipos de reação de hipersensibilidade (HR) desenvolvidas em folhas de pimenta *Capsicum baccatum* var. *praetermissum* (Heiser & P. G. Smith) Hunz. Folhas inoculadas com suspensões bacterianas contendo 10^8 UFC/mL (A) e 10^7 UFC/mL (B). À direita da nervura principal foram infiltradas suspensões da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 selvagem; à esquerda da nervura principal foram infiltrados, de cima para baixo, o mutante Δ XAC3982, o mutante da região intergênica parcial Δ RIP3980/81 e o tampão fosfato 1X (controle negativo). Sintomas de HR aos 3 DAI (dias após inoculação) [A1 e B1], 5 DAI [A2 e B2], 7 DAI [A3 e B3] e 10 DAI [A4 e B4].

Durante o processo de infecção, a bactéria passa por uma fase epífita até que consiga penetrar o hospedeiro pelas aberturas naturais da planta, como por exemplo os estômatos, ou mesmo pelas regiões onde ocorreram lesões no tecido vegetal decorrente de ventos muito fortes ou pela ação do homem (Oliveira et al., 2008).

Ao penetrar o tecido vegetal a bactéria precisa coordenar um complexo mecanismo que envolve muitos genes, inclusive alguns ligados a patogenicidade e virulência, para que assim consiga obter os nutrientes necessários para a sua sobrevivência e multiplicação nesse ambiente hostil. Da mesma forma, a planta precisa reconhecer a bactéria e ativar uma resposta específica a esta. Neste momento ocorre uma interação entre o patógeno e o hospedeiro, onde são produzidas proteínas

de ataque e de defesa que determinarão se essa interação será compatível ou incompatível (Flor, 1971 apud Artier, 2010).

A interação entre uma planta e um patógeno classificada como incompatível acontece quando os genes de resistência da planta codificam proteínas receptoras (R) que são capazes de interagir especificamente com uma proteína efetora (Avr), codificada pelo gene avr do patógeno, desencadeando uma resposta de hipersensibilidade (“hypersensitive response” – HR). Essa resposta leva à morte celular no local de infecção e à consequente contenção do patógeno. Na interação compatível a bactéria consegue mascarar os mecanismos de defesa da planta e consequentemente desencadeia a doença (Keen, 1990).

Diante da falta de informações disponíveis a respeito da função do gene XAC3982, investigou-se os possíveis efeitos desta mutação em relação aos efetores de virulência de Xac. Assim, caso os sintomas observados em pimenta fossem diferentes de HR, seria um sinal de que essa mutação poderia ser relacionada a algum gene efetor de Xac, contudo esta hipótese não foi confirmada.

4.5.4 Formação de biofilme em meio de cultura NB e XVM2 e produção de goma xantana

Houve diferença significativa na produção de biofilme entre o mutante Δ XAC3982 e a Xac selvagem. O mutante Δ XAC3982 produziu 50% menos biofilme em meio NB quando comparado com a estirpe selvagem, enquanto o mutante Δ RIP3980/81 não apresentou diferença significativa na produção de biofilme em relação à Xac (Figura 27). Contudo, a produção de biofilme em meio mínimo XVM2 não apresentou diferença significativa entre os mutantes e a Xac selvagem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) (Figura 28). Como, de acordo com a base de dados de proteínas UniProt (The UniProt Consortium, 2019), a sequência da proteína hipotética referente ao mutante Δ XAC3982 possui homologia com proteínas que apresentam 98,1% de identidade com uma família de proteínas fago holina e estas proteínas contribuem para a formação de biofilme, este poderia justificar a menor produção por esse mutante já que o gene foi interrompido.

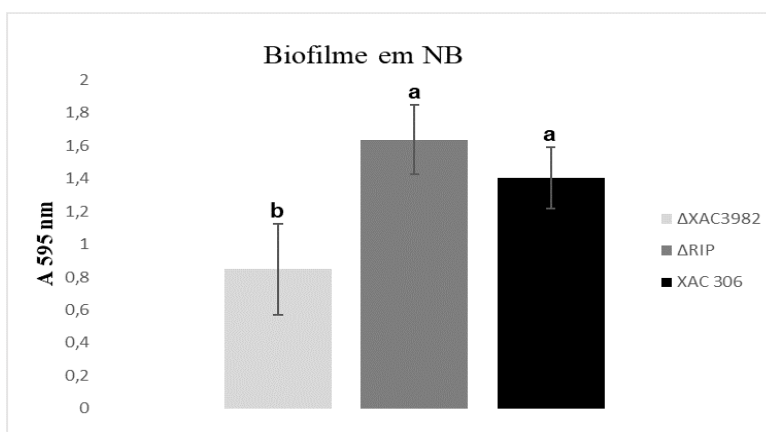


Figura 27. Quantificação de biofilme *in vitro* em meio de cultura NB pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 e pelos mutantes ΔXAC3982 e ΔRIP3980/81 por meio da leitura da densidade ótica (DO 595nm). O experimento foi realizado com quatro réplicas técnicas e quatro réplicas biológicas. As letras diferentes significam diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). As barras representam o erro padrão das médias.

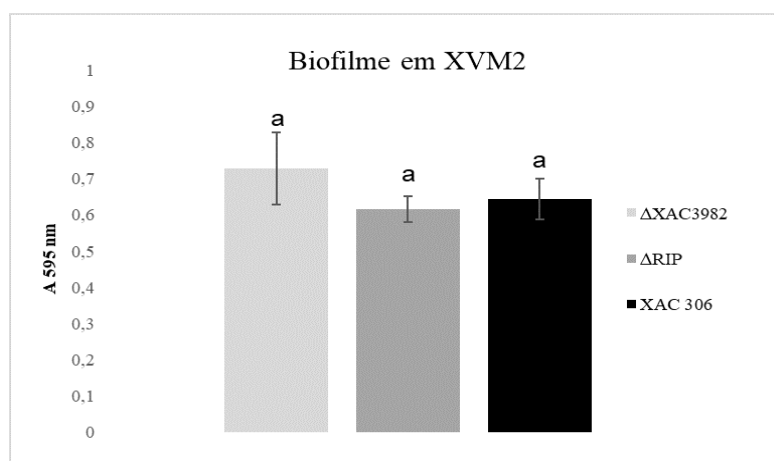


Figura 28. Quantificação de biofilme *in vitro* em meio de cultura XVM2 pela *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 e pelos mutantes ΔXAC3982 e ΔRIP3980/81 por meio da leitura da densidade ótica (DO 595nm). O experimento foi realizado com quatro réplicas técnicas e quatro réplicas biológicas. As médias seguidas pela mesma letra não têm diferença estatística pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). As barras representam o erro padrão das médias.

A formação de biofilme é um fator importante relacionado com a virulência de bactérias e desempenha um papel fundamental no estabelecimento das interações patógeno-hospedeiro (Danhorn e Fuqua, 2007, Malamud et al., 2011), tendo como função a adesão e proteção das bactérias contra agentes bióticos e abióticos (Sena-Vélez et al., 2015, Yan e Wang, 2011).

O meio mínimo XVM2 é um meio limitado e que simula as condições do apoplasto das células vegetais (Sena-vélez et al., 2015), ou seja, um ambiente com limitação de nutriente, onde a bactéria é submetida a uma condição de estresse.

Uma possível explicação para o desempenho do mutante Δ XAC3982 ao formar biofilme da mesma forma que a estirpe selvagem em XVM2 seria porque o mutante teve a necessidade de expressar vias metabólicas necessárias à sua sobrevivência quando em condições limitadas de nutrientes, já que os nutrientes ali presentes não se assemelham àqueles presentes no meio de cultura completo, como é o NB. Uma destas vias seria a de produção de biofilme. Em contrapartida, quando cultivado em NB, ele possuía as condições favoráveis para o seu estabelecimento e não precisou ativar as mesmas vias metabólicas, mantendo-se em estado de latência e por isso acabou tendo uma produção menor de biofilme do que a Xac.

Rigano e colaboradores (2007) observaram que mutações em genes que interferem na formação de biofilme também podem limitar ou inviabilizar a produção de goma xantana, já que os dois processos são interligados. Sendo assim, para confirmar se a menor produção de biofilme teria ou não relevância para o Δ XAC3982, foi avaliado se esse mutante era capaz de produzir goma xantana. Entretanto, não houve diferença na produção de goma xantana entre os mutantes Δ XAC3982, Δ RIP3980/81 e a estirpe selvagem de Xac 306 (Figura 29) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

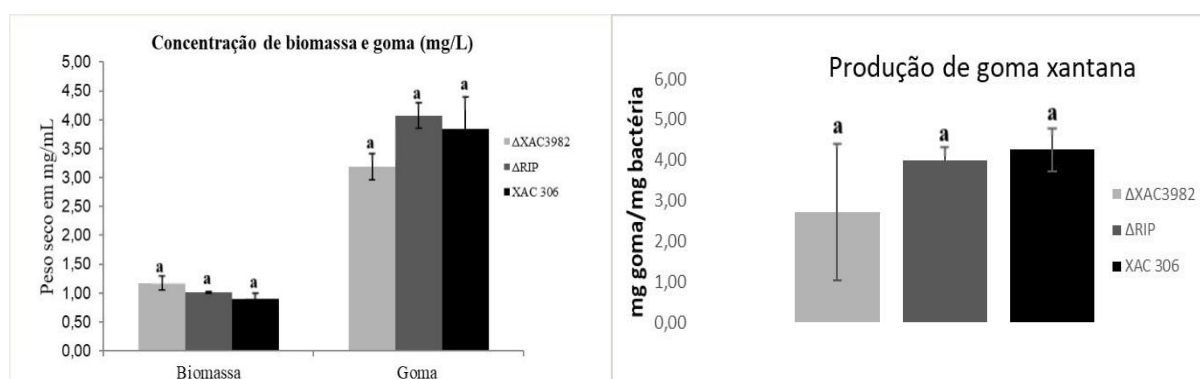


Figura 29. Produção de goma xantana nas estirpes *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306, mutante Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. As barras representam o erro padrão das médias.

A goma xantana é o polissacarídeo extracelular característico produzido pelas *Xanthomonas* spp. (Buttner e Bonnas, 2010) e, apesar de não ser considerada essencial para os estágios iniciais de infecção, facilita a manutenção de bactérias na planta hospedeira, possivelmente melhorando a colonização de tecidos distantes (Dunger et al., 2007). Genes com mutações que afetam a produção de goma xantana muitas vezes são incapazes de formar biofilme *in vitro* e *in vivo* (Rigano et al., 2007).

Não houve alteração na capacidade de produzir goma xantana para os dois mutantes aqui discutidos. Diante deste resultado, a menor produção de biofilme apresentada anteriormente parece não ter relação com o processo infeccioso de Xac, já que esse mutante não apresentou dificuldades em produzir a goma xantana, que é um elemento diretamente envolvido no processo de formação de aglomerados celulares no biofilme. Assim, pode-se concluir que o gene XAC3982 e a região intergênica aqui deletados, não têm relação com a produção de biofilme e não têm influência na formação de goma xantana pela Xac 306.

4.6 Análise das motilidades “swimming” e “swarming”

Ambos os testes de motilidade “swarming” e “swimming” não mostraram diferenças significativas entre a estirpe Xac 306 e os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81. Este resultado sugere que os dois mutantes não estão envolvidos com o mecanismo de formação de flagelos e motilidade bacteriana (Figura 30). O Teste de “Tukey” foi empregado ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

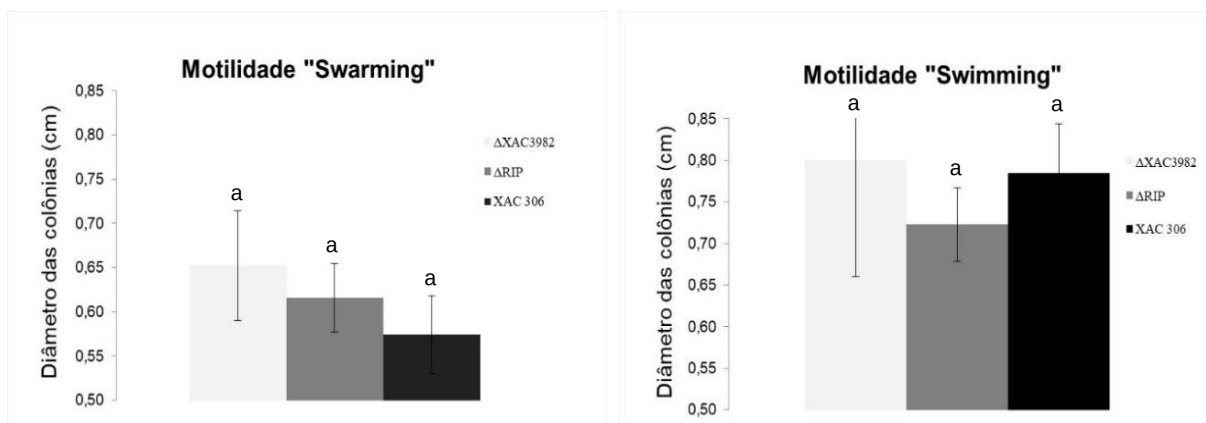


Figura 30. Teste de motilidade “swarming” realizado em meio semi-sólido (0,7% de ágar) e “swimming” realizado em meio semi-sólido (0,3% de ágar) para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* estirpe 306 e para os mutantes Δ XAC3982 e Δ RIP3980/81. As barras no gráfico representam o desvio padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. O teste foi realizado com quatro réplicas biológicas e quatro réplicas técnicas.

4.7 Análises *in silico* da proteína hipotética XAC3982

A sequência da proteína referente ao gene XAC3982 é descrito como hipotético, porém, após análises *in silico*, foi identificada uma homologia com duas regiões de domínios de hélice transmembrana, uma na posição do aminoácido 70 a 92 e outra na posição 102 a 124 (Figura 31).

De acordo com as demais análises *in silico* utilizando as ferramentas OrthoDB (Kriventseva et al., 2018), TMPred (Hofmann e Stoffel, 1993) e TMHMM versão 2.0 (Moller et al., 2001), esses domínios são associados a proteínas transmembranas helicoidais.

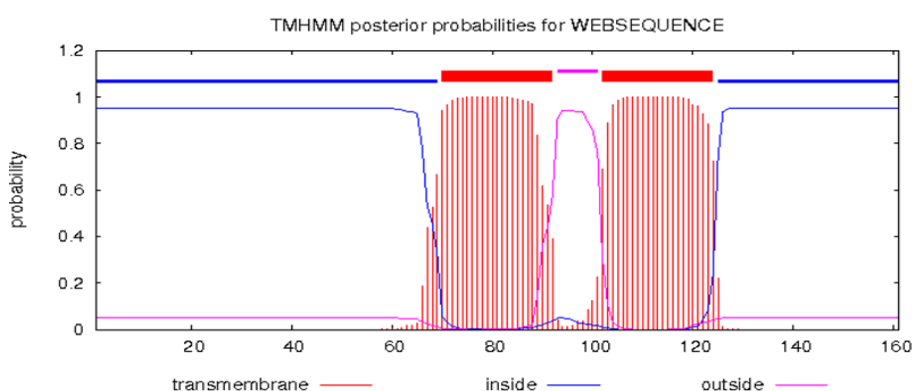


Figura 31. Predição da região de hélices transmembrana da proteína hipotética XAC3982. O programa TMHMM mostrou a possível presença de duas hélices transmembrana entre as posições 70 - 92 e 102 – 124 da sequência da proteína.

A ferramenta InterProScan (Jones et al., 2014) prevê que esta proteína possui similaridade com o domínio Phage_holin_3_6 (IPR009937). As holinas são pequenas proteínas hidrofóbicas que contêm de um a três domínios transmembranares (Guerra, 2017) e juntamente com as endolisinas, em bacteriófagos, têm papel importante na degradação de peptidoglicano da parede e membrana celular do hospedeiro (Young e Bläsi, 1995; Wang, Smith e Young 2000).

As holinas são um grupo diverso de proteínas que se enquadram em 58 famílias distintas (Reddy e Saier, 2015) e têm como função principal o acesso de suas endolisinas associadas à parede celular (Desvaux, 2012). Para induzir a lise do hospedeiro, alguns bacteriófagos utilizam a estratégia “holina-endolisina” e sintetizam uma endolisina, que é essencial para a hidrólise rápida do peptidoglicano e uma segunda proteína membranar, a holina, que permite a liberação ou ativação da endolisina num período de tempo bem definido (Catalão, 2010). São também apresentadas como um sistema de secreção alternativo para algumas proteínas que não possuem peptídeo sinal (Desvaux, 2012).

As holinas formam poros nas membranas citoplasmáticas das bactérias com o objetivo principal de liberar endolisinas que hidrolisam a parede celular e induzem a morte celular (Fernandes, 2016). Em geral são produzidas sem sequências sinalizadoras características de proteínas exportadas através da via secretória geral, também chamada de translocase Sec (Saier et al., 2008).

5 Considerações finais

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que os genes *htrA*-XAC3983 constituem um operon funcional no genoma da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306 (Xac 306) e não apenas os genes XAC3981-3983 como predito por alguns programas preditores de operons em procariotos. Esse operon parece ter papel na patogenicidade da Xac 306, já que a mutação em um dos seus genes (XAC3982) alterou a produção de biofilme e atenuou o fenótipo *in planta*.

O mutante XAC3982 produz sintomas atenuados em genótipos cítricos resistentes e suscetíveis, tem homologia com proteínas holinas, uma classe de proteínas transmembranares. Esta é a primeira constatação de que a proteína codificada pelo gene XAC3982 possivelmente tenha sua função relacionada a uma proteína transmembrana. Experimentos adicionais a respeito dessa característica poderão corroborar esta hipótese.

As regiões promotoras preditas neste trabalho não são responsáveis pela transcrição dos genes do operon.

Novos estudos a respeito do operon *htrA*-XAC3983 são necessários para compreender como é regulada essa transcrição, assim como qual é o seu papel na interação patógeno-hospedeiro.

6 REFERÊNCIAS

- Alberts et al (1999) **Fundamentos de biologia celular**, uma introdução a biologia molecular da célula. c. 6: 191.
- Amaral AM (2003) **Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo**. Comunicado técnico 86, Embrapa Brasília, novembro.
- Amaral AM et al. (2005) Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, 30:292-294.
- Amaral AM et al. (2006) Plataformas tecnológicas no estudo da bactéria causadora do cancro cítrico: genômica, transcriptômica e Proteômica. **Laranja**, 27:355-372.
- Amorim JAS (2018) **Genes do metabolismo do nitrogênio e suas implicações na patogenicidade e virulência da *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Artier J (2010) **Análise proteômica diferencial da fração periplasmática de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: proteínas relacionadas com a indução da patogenicidade *in vitro***. 78f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - SP.
- Azeredo J (2013) O potencial biotecnológico dos bacteriófagos na detecção e controle de bactérias patogênicas. **Boletim de Biotecnologia**, Braga, novembro 2013.
- Backert S et al. (2018) Extracellular HtrA serine proteases: An emerging new strategy in bacterial pathogenesis. **Cellular Microbiology**, 20:12845.
- Barbosa, JC, Maldonado JW (2015) **Experimentação Agronômica & AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. 1. ed. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, p. 247-278.
- Behlau F, Sala I, Bassanezi RB (2017) **Cancro cítrico: medidas essenciais de controle**. 3. ed. Araraquara: Fundecitrus.
- Belasque JJ et al. (2005) Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia Brasileira**, 30:387–393.
- Bendtsen JD et al. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, 340:783-795.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Prokaryotic DNA-Binding Proteins Bind Specifically to Regulatory Sites in Operons. In: Freeman WH. **Biochemistry**, New York: v. 31.1.

Berman HM et al. (2007) The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB): Ensuring a single, uniform archive of PDB data. **Nucleic Acids Research**, 35:301-303.

Bitancourt AA (1957) O cancro cítrico. **Biológico**, 23:101-111.

Browning DF, Busby SJ (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Review Microbiology**, 2:57-65.

Brunings AM, Gabriel DW (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, 4:141-157.

Bustin SA, Nolan T (2004) Pitfalls of quantitative real-time Reverse transcription polymersa chain reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, 15: 3.

Buttner D, Bonas U (2010) Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiology Reviews**, 34:107-33.

Catalão MJGFC. (2010) **Characterization and functional analysis of the gp1 accessory lysis protein in *Mycobacterium smegmatis* infection by the mycobacteriophage Ms6**. Tese de doutorado, Farmácia (Microbiologia), Universidade de Lisboa, Faculdade de Farmácia, 229p.

Cernadas RA, Camillo LR, Benedetti CE (2008) Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*. **Molecular Plant Pathology**, 9:609-631.

Coletta-Filho HD et al. (2006) Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100:279-85.

Da Silva ACR et al. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, 417:459-463.

Danhorn TE, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, 61:401–422.

Das AK (2003) Citrus canker: a review. **Journal of Applied Horticulture**, 5:52-60.

Dehal PS et al. (2009) MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics. **Nucleic Acids Research**, 38:396–400.

Denny TP (1995) Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, 33:173-197.

Desvaux M (2012) Contribution of holins to protein trafficking: secretion, leakage or lysis? **Trends in Microbiology**, 20:259-261.

Domingues MN et al. (2010) The *Xanthomonas citri* effector protein PthA interacts with citrus proteins involved in nuclear transport, protein folding and ubiquitination associated with DNA repair. **Molecular Plant Pathology**, 11:663-75.

Drennan A et al. (2012) Key roles of the downstream mobile jaw of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription initiation. **Biochemistry**, 51:9447-59.

Ermolaeva MD, White O, Salzberg SL (2001). Prediction of operons in microbial genomes. **Nucleic Acids Research**, 5:1216-1221.

Ference CM et al. (2017) Recent advances in the understanding of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, 19:1302-1318.

Fernandes ASC (2016) **Endolysins as Antibacterial Agents: from Engineering Approaches to the Uncovering of Holin as a Key Factor Influencing Lytic Activity**. 219f. Tese (Doutorado) Universidade de Lisboa, Lisboa.

Ferreira CB (2009) **Caracterização fenotípica e funcional de mutantes da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Ferreira CB et al. (2017) Identification of new genes related to virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* during citrus host interactions. **Advances in Microbiology**, 7:22-46.

Ficarra FA et al. (2017) *Xanthomonas citri* ssp. *citri* requires the outer membrane porin OprB for maximal virulence and biofilm formation. **Molecular Plant Pathology** 18:720-733.

Figueiredo Filho DB, Silva Junior JA (2009) Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**. 18:115-146.

Fundecitrus - Fundo de Defesa Da Citricultura. (2018) Secretaria da Agricultura de São Paulo muda lei de controle de cancro cítrico. In: **Comunicação**.

Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS (2002) Citrus canker: The pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.

Graham JH et al. (1992) Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, 82:1319-1325

Graham JH et al. (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, 1:1-15.

Griffiths AJF et al. (2000) **Introduction to Genetic Analysis**. New York: W. H. Freeman; 2000.

Guo Y et al. (2010) Requirement of the *galU* gene for polysaccharide production by and pathogenicity and growth *in planta* of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Applied and Environmental Microbiology**, 76:2234-2242.

Hofmann K, Stoffel W (1993) TMbase - A database of membrane spanning proteins segments **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, 347:166.

Jaciani FJ (2012) **Diversidade genética de *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri*, caracterização molecular e patogênica de *Xanthomonas fuscans* SUBSP. *aurantifolia* E DETECÇÃO DE *Xanthomonas alfalfae* em citrumeiro 'Swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) no Brasil**. 191 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

Jacobs MA (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100:14339-14344.

Jácomo CS (2014) **Avaliação da administração da cepa mutante S2308 Δ virB10 de *Brucella abortus* em camundongos balb/c**. 56f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

Jalan N et al. (2013) Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, 14:551.

Jones P et al. (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, 9:1236-1240.

Käll L, Krogh A, Sonnhammer ELL (2004) A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. **Journal of Molecular Biology**, 338:1027-1036.

Katzen F et al. (1996) Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. **Journal of Bacteriology**, 178:4313-4318.

Keen NT (1990) Gene-for-gene complementarity in plant -pathogen interactions **Annual Review of Genetics**, 24:447-63.

Kelley LA et al. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, 10:845–858.

Kim JF, Wei ZM, Beer SV (1997) The hrpA and hrpC operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. **Journal of Bacteriology**, 179:1690-1697.

Kriventseva EV et al. (2018) OrthoDB v10: sampling the diversity of animal, plant, fungal, protist, bacterial and viral genomes for evolutionary and functional annotations of orthologs. **Nucleic Acids Research**, 47: D807–D811.

Laia ML et al. (2009) New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, 9:12.

Lee J, Lee HJ, Shin MK, Ryu WS (2004) Versatile PCR-mediated insertion or deletion mutagenesis. **BioTechniques**, 36:398-400.

Li J, Wang N (2011) 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**, 12:381-96.

Li R, Xu I, Shi H (2015) Strategy of tuning gene expression ratio in prokaryotic cell from perspective of noise and correlation. **Journal of Theoretical Biology**, 365:377-389.

Lo YM, Yang ST, Min DB (1997) Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 47:689-694.

Luan O et al (2017) Hypothetical Protein BPSL3393 of Burkholderia pseudomallei is Involved in Ethanolamine Catabolism. **Tropical Life Sciences Research**, 28:57-74.

Malamud F et al. (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, 157:819-29.

Mao et al (2014) DOOR 2.0: presenting operons and their functions through dynamic and integrated views. **Nucleic Acids Research**, 42:654-659.

Martins PMM et al. (2010) Sub cellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, 310:76-83.

Mendoza EFR (2016) **Identificação de genes-alvos na patogenicidade de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com enfoque no sistema de secreção tipo III**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP.

Moller S, Croning MDR, Apweiler R (2001) Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. **Bioinformatics**, 17:646-653.

Moreira DS (2016) **Construção de novos promotores funcionais em *Escherichia coli* por meio de síntese química de dna randomizada**. 97f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Moreira LM et al. (2017) Proteomics-based identification of differentially abundant proteins reveals adaptation mechanisms of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during *Citrus sinensis* infection. **BMC Microbiology**, 17:155.

Nelson DL, Cox MM (2014) **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 1298 p.

Neves MF, Trombin VG (2017) **Anuário da citricultura**. São Paulo: CitrusBR, 57p.

O'brien JA et al. (2012) A Peroxidase-Dependent Apoplastic Oxidative Burst in Cultured Arabidopsis Cells Functions in MAMP-Elicited Defense. **Plant Physiology**, 4:2013-2027.

Oliveira RP et al. (2008) **Cancro cítrico: epidemiologia e controle**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado 40p. (Documentos, 23).

Ramalho MAP, Santos JB, Pinto CAB (2012) **Genética na agropecuária**. 5ed. Lavras, Ufla, 566 p. 2012.

Reddy BL, Saier MH (2013) Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, 1828:2654-2671.

Rigano LA et al. (2007) Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 20:1222-30.

Ruberti M. Regulação da Expressão Gênica em Procariontes - Sistema Operon da lactose. 2013. Disponível em www.biomedicinaemacao.com.br.

Saier MH et al. (2008) Protein secretion and membrane insertion systems in bacteria and eukaryotic organelles. **Advances in Applied Microbiology**, 65:141-197.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Plasmid vector. In: **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.1:1-110.

Schaad et al. (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, 29:690–695.

Seemann T (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, 15:2068-9.

Sena-Vélez M et al. (2015) Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. **Plant Pathology**, 4:767-775.

Shi et al. (2012) Characterization and determination of holin protein of *Streptococcus suis* bacteriophage SMP in heterologous host. **Virology Journal**, 9:70.

Solovyev V, Salamov A (2011) Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In: Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies (Ed. R.W. Li), Nova Science Publishers, p. 61-78.

Souza LCA (2002) **Produção e caracterização de mutantes do operon Gum de *Xylella fastidiosa***. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Sun X et al. (2004) Detection and characterization of a new strain of citrus canker bacteria from Key/Mexican Lime and Alemow in South Florida. **Plant Disease**, 88:1179–1188.

Szklarczyk D et al. (2017) The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic Acids Research**, 45:362-68.

Taboada B et al. (2011) ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. **Nucleic Acids Research**, 40:627–631.

The UniProt Consortium, UniProt: a worldwide hub of protein knowledge (2019) **Nucleic Acids Research**, 47:506–515.

UCCI, Amanda Piovesan (2009) **Participação da ORF XAC3629 na regulação do operon de resistência a cobre copAB em *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2009. 58 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química.

Vauterin L et al. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 45:472–489.

Vernière CJ et al. (1998) Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal of Plant Pathology**, 104:477–487.

Vojnov AA et al. (2001) Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. **Molecular Plant–Microbe Interaction**, 14:768–774.

Wang B et al. (2017) Dissecting the virulence-related functionality and cellular transcription mechanism of a conserved hypothetical protein in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, 19:1859-1872.

Wang IN, Smith DI, Young R (2000) "HOLINS: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections." **Annual Review of Microbiology**, 54:799.

Watson, JD et al. (2006) **Biologia molecular do gene**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 728p.

Yan Q, Wang N (2011) The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Bacteriology**, 193:1590-1599.

Yan Q, Wang N. (2012) High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 15:69–84.

Yang J et al. (2015) The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. **Nature Methods**, 12:7-8.

Young R e Bläsi U (1995) Holins: form and function in bacteriophage lysis. **FEMS Microbiology Reviews**, 17:191-205.

APÊNDICE

Apêndice A. Sequenciamento do operon XAC3980-3983.

O transcrito amplificado com os oligonucleotídeos XAC3980 F e XAC3983 R foi submetido a reação de sequenciamento para a confirmação do operon XAC3980-3983. Abaixo estão os resultados do sequenciamento com cada um dos oligonucleotídeos específicos para cada gene.

Oligonucleotídeo >XAC3980 F

G--A-C-TAA-GCTG-

CTTCTGCGGCTTTGCCGCCACCGGCATCAACGCCTGGCTCGACAATCGCGCCGAAGCCACACCCCCAGCAACGCCGCTTTA
CCCTGCCGACGGCCGCCGCATTGCCGGCGCGGTGGCCGGCCAACCTGTGCCGTCGCTGGCGCCGATGCTGCAGCAGGCCATG
CCCGCGGTGGTGAGCGTGAACACCAAACAGGTGGTGCGCTCCGCAACCCGTTCTTCAACGACCCGATCCTGCCCGGCTGTT
TCCGCAGGTGCCGAGGACCGCATCAACGAGTCGCTGGGTTCCGGCGTGATCATCGATGCGCAAAAAGGTATGTGCTGACCA
ATCACCACGTTCATGAAAACGCCGACGACGTGCAGGTGACGCTCGGCGACGGACGCACGGTCAAGGCCGAGTTCATCGGCTCC
GATGCCGATACCGATATTGCGCTGATCCGCATCAAGGCCGACAACCTCACCAGATATCAAACCTGGCCGACAGCAACGCGCTACG
CGTGGGCGATTTTGTGGTGGCCATCGGCAACCCGTTCCGGCTTCACCCAGACCGTCACCTCCGGCATCGTCTCGGCAGTGGGGC
GCAGCGGATTCGCGGCTTGCTGCTACCAGAACTTCATCCAGACCGATGCCGTCATCAACCCCGCAACTCGTGCAGCGCGCTG
GTCAACCTGCAAGGCCAGTTGGTTGGCATCTACACCGCCAGCTTCTATCCGCATGTACAGCATGGCCGGCAATATCGGCCTGG
GGCTGGTCGATTACCGTCCAATCCTGGCTCGCAATGTCTGTCGAGCAATTGATGACTAAGGGCGTGGTGGCGCTCGGCACGCTC
GGTCTGGGAGACCCAGAACCTCAC--A-AGATGCTGCAGTACTGGGGGTG-ATTGTTGCCGCGGCGCATTTGG-
GACACGCGTGTGCGGGGCTC-CATCTGCTGCGGAC-GGCGATGCAA--GGCGATG----TG--GGCTGT-CC-ACGAAC-
GCGCGATG-TCAGTCGCC-----CCGCTGGCA-A-TTACG-----TGAG-CGTG-CATGCTCG--ATCCTGGAATTC---
CGT-----CAAGTCCGT-C-A--TCA---C-CTT-----A-ACT-----C---CCC-----T---TGGCC

Oligonucleotídeo XAC3980 R

CC-----A---A---GCACGACAGCTGCTGCGGTTTACGTTGGAAATTGGCCCGCCAGCTGGCAAGGT---CGAA-
TCGCCCACGCTGCTGGCCACGATCACATCGCCGGCGACAGGCCGTTGGCGGCAGCGCGACCGCCGCGTTTGACCTCGCTCAC
CATACCCCGGTGATGCCCGACTGACGCAGCGATTCCGGGAGATCGACGAAGGTGCGCGCCGTCAGACGCGGGTCCAGCATGT
CGCCGGTGATGGCGCGGTCCTGCTCTCTCAGCGTGGCCTTGAGTTTGAGCGGCTTGCCATCGCGACGGATATCCAGGGTCACC
GACTGCCAACCGCCTGCAGGCCTTCGTAGTTGTGTCAGCGCTTCGGCGCTGTCCACGCGCTGGTTCGTTGGCCGCCACACGAC
ATCGCCCGGTTGCACGCCCTGCCGCCGCGCTGCGGAGCCCGCAACACCCGTGTACCAATGCGCCGCGCAACGAATCCACCC
CCAGGCCCTGCAGCATCTGTTGGGTGAGGTTCTGGGTCTCCAGGCGAGCGTGCCGCGCACACACGCGCTTGGTCACCAAT
TGCTCGAGGCAATTGCGCGCCAGGTTGGACGGAATCGCCAGCCCGAGCCGATATTGCCGCGCATGCTGCCCTGCGGATTGAA
GCTGGCGGTGTTGATGCCAACCAACTGGCCTTTGCAGGTTGACAGCGCGCCGCTGAGTTGCCGGGGTTGATCGAGGGCAT
CGGTCTGGATGAAGTTTCTGGGTAGCCCAAAGCCGCCTAATCCCTGT

Oligonucleotídeo >XAC3981 R

GG-----G-T---AG-CAGCGGCGAGGCAACGCCGAAGGCGGCCAGCGGACGCTCGCGGATCAGATCGGTG-

CGCTTTCCAGCAGATCGTTGCCCTTGGCAACCAGGACGTCGATCTGCTCCTTGGCAGCGGCACCGCCGAACTCGGCAGCGGCC
ATGCCGGCCAGCGCGGTGTCCGACAGTTCGGCCTTGACGTTGGCGCGACCGAGCTTGAGCTCATCGCCGGCGGCGCTGGTCGC
ACCCCTGACGGCTTCGCCGGCGGCGTTTTCGGCCGACTTCAGATGGGTGCCGCTTCGCTCAGGTTTTCCTTCAGCTGATCGG
TATTGGTGGGGCTCATGCGATATCTCCTTCGGTCATTGATGGCAGCCGCCATCACGTGCGGTGAGCGGTAGCAATAGCACC
GGGGGGGTGTAGGAGGCGTTAGTGCAACCAATTTTCGGTACACAGTGCGTCAACGCATCAGCGCGTCGTACTGCGCGTTGCCA
CGCAGGATACGCACGACAAGCTGCTGCGGTTTACGTTGGAAATTGGCCCGCCAGCTGGCAAGGTGCGGCAACTCGCCACGCT
GCTGGCCACGATCACATCGCCGGCGACAGGCCGTTGGCGGCAGCGCGACCGCCGCGTTTGACCTCGCTCACCATCACCCCGG
TGATGCCCGACTGACGCAGCGATTCCGGGAGATCGACGAAGGTGCGCGCCGTCAGACGCGGGTCCAGCATGTGCGCGGTGATG
GCGCGGTCTGCTCTCTCAGCGTGGCCTTGAGTTTGAGCGGCTTGCCATCGCGACGGATATCCAGGGTCACCGCACTGCCAAC
CGCTGCGAGGCTTTTCGTAGTTGTGTCAGCGCTTTCGGCGCTGTCCACGCGCTGGTTCGTTGGCCGCCACCACGACATCGCC
GGGTTGCACGCTGCGCTGCTGCCGCTGGC-GAGCCC-GGCA-
CACCCGTGTCAACAAATGCGCCGCGCAATCGAATTCACCCCTCC-AGGTCCCTTGC-G-ATCTTGTGTTGGG-
TGAAGGTTCTTGGG----TC

Oligonucleotídeo >XAC3982 R

GGG-----A-T----

TTTGCCGGGGTCATCGAAATCCCAAGCTTGATGAGCTGACGGCGCGTTGCATTTATGCCGGATGGTCTGAAGTAGAAGAACACA
CGCCATG--AATGCCGGTCACCAACAGACTCGCCAACGCAGTGAAAAACATCGCCTGGAACCACGACAGCCCGGCACGCTGCAGCAGGGCGA
TGATGGCGCCAGCCAGCAATAACCATGACGAGGCACCGAACACCACGGCCACGCAGGCCAGGCCAGGCCCTCGCCGAATGCG
CTGCGTGCCAGTTGCAGATCAGCCGACACCAGCCGGCGCAAGGCGCGACTGGTGTCTTTGGCCGAGCCAGCGTGGCACGGCC
GGCGGCGCCGACCGCACGTACGCTTTTCGTCCAGTCCTGGCGTTTTCGCGCGCGCGTCTGGCGTGTTCCTGTTTCGGCAGCGGGA
GAGGCCTGATCGCTCACGACTTAGTTGTCTGCTGTGTGCCAGCTTGGCAATGACCCACCCAGCGGCGAAGGCAACGCCGAA
GGCGGCCAGCGGACGCTCGCGGATCAGATCGGTGGCGCTTTCAGCAGATCGTTGCCCTTGGCAACCAGGACGTCGATCTGCT
CCTTAGCAGCGGCACCGCCGAACCTCGGCAGCGGCCATGCCGGCCAGCGCGGTGTCTGGACAGTTTCGGCCTTGACGTTTGGCGCG
ACCGA-CTTGATCTCATC**Oligonucleotídeo >XAC3983 R**

C-----AC-G--ACGGCGGG-C--CTGC-ACTTCCTC--GCATTGTCTGCAGCACGTTTCGGTT--TC-TT

TTCTTGCACGGTGCGCGGTGAACAG--GA--ATG-T-

CTGATCATCTGCAGAAGCTTGGGAATACCGCCAAGCTTGCTGGCGATGCTCCCAATGCCGCTT-

GGTTTCATTACGGCCGGTGACAAACCCAGCCGAAGCCACCGTCATAATGCGCAGTGGGGACCAACCGGCACGCCAGGTCTG
GCGGAGTTTCGCTCCAATGCAGGCGCGTTTCTTGGGCACGTCCTTCGACCAGATATTCGGCGCGTTTCGACGCGTTGACGCAAGG
TTCCAAATTTTCATGGACGTGCTCCACTGGCAGAGGTCGCCGCTCATCGTCTTTGCCGGGGTCATCGAAAATTTAAGCCTGA
TTAGCTGACGGCGCGTTGCATTTCATGCCGGTATGGCCCCACTATTTTTATTTTCGCGCCATGCCGCAATGCCCCGCCCCAACA
GACTCGCCAACGCAGTGAAAAACATCGCCTGGAACCACGACAGTTGTGGGGACGCTGCAGCAGGGCGATGATGGCGCCTGCTT
TTTTTTTTTCCATGACGAGGCACCGAACACCACGGCCACGCAGGCCAGGCTAGGCCTCGCCCGAATGCGCTGCGTGCCAGTTT
GCAGATCATCCGACACCAGCCGGCGCAAGGTTCGCGACTGGTGTCTTTGGCCGAGCCCCATCGTGGCACGGCCGGCGGCGCCGA
TCACACGTAACGCTTTTCTTCATCCCTGGCCGTTTTGTGCGCGCCGCGTCTGGTGCCTCGGCTTCTGGCAGCCGGGAGAGGCC
TTGATCCCTTAACCTATTTT

Apêndice B. Blastn dos oligonucleotídeos utilizados para a mutação sítio dirigida por PCR.

Os oligonucleotídeos utilizados para a mutação sítio dirigida por PCR de extensão por sobreposição (A, B, C e D, disponíveis na Tabela 3) foram contrastados com o genoma da Xac 306 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306, NCBI: txid190486) usando a ferramenta Blastn disponível no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para cada um dos mutantes foi confirmada a especificidade dos oligonucleotídeos e o correto anelamento nas regiões de interesse (Figuras B1 a B4).

A Query 11 TGAGCGAGGTCAAACGCG 28 Sbjct <u>4.674.658</u> TGAGCGAGGTCAAACGCG <u>4.674.675</u>	B Query 10 TCCGGCAGCGGGAGAGGC 27 Sbjct <u>4.675.357</u> TCCGGCAGCGGGAGAGGC <u>4.675.340</u>
C Query 10 GGCAAAGACGATGAGGCG 27 Sbjct <u>4.675.766</u> GGCAAAGACGATGAGGCG <u>4.675.783</u>	D Query 7 CCACATGTGGCGCGCATCT 26 Sbjct <u>4.676.500</u> CCACATGTGGCGCGCATCT <u>4.676.481</u>

Figura B1. Blastn dos oligonucleotídeos A, B, C e D desenhados para o mutante Δ XAC3982. As numerações sublinhadas correspondem as posições onde cada um dos oligonucleotídeos se anela no genoma da Xac 306 e são crescentes em **A** (4.674.658 – 4.674.675) e **C** (4.675.766 – 4.675.783), onde os dois oligonucleotídeos são diretos (F), enquanto em **B** (4.675.357 - 4.675.340) e **D** (4.676.500 – 4.676.481) são decrescentes, já que os oligonucleotídeos são reversos (R).

A Query 10 CAGCTTCAATCCGCAGGGC 28 Sbjct <u>4.674.155</u> CAGCTTCAATCCGCAGGGC <u>4.674.173</u>	B Query 10 AATAGCACCGGGGGGGTG 27 Sbjct <u>4.674.903</u> AATAGCACCGGGGGGGTG <u>4.674.886</u>
C Query 10 ATGAGCCCCACCAATACC 27 Sbjct <u>4.674.962</u> ATGAGCCCCACCAATACC <u>4.674.979</u>	D Query 9 CGCAGTGAAAAACATCGC 26 Sbjct <u>4.675.648</u> CGCAGTGAAAAACATCGC <u>4.675.631</u>

Figura B2. Blastn dos oligonucleotídeos A, B, C e D desenhados para o mutante Δ RIP3980/81. As numerações sublinhadas correspondem as posições onde cada um dos oligonucleotídeos se anela no genoma da Xac 306 e são crescentes em **A** (4.674.155 – 4.674.173) e **C** (4.674.962 – 4.674.979), onde os dois oligonucleotídeos são diretos (F), enquanto em **B** (4.674.903 - 4.674.886) e **D** (4.675.648 – 4.675.631) são decrescentes, já que os oligonucleotídeos são reversos (R).

A	Query	10	CAGCTTCAATCCGAGGGC	28		B	Query	10	TCAACGCATCAGCGCGTC	27
	Sbjct	<u>4.674.155</u>	CAGCTTCAATCCGAGGGC	<u>4.674.173</u>			Sbjct	<u>4.674.845</u>	TCAACGCATCAGCGCGTC	<u>4.674.828</u>
C	Query	10	ATGAGCCCCACCAATACC	27		D	Query	9	CGCAGTGAAAAACATCGC	26
	Sbjct	<u>4.674.962</u>	ATGAGCCCCACCAATACC	<u>4.674.979</u>			Sbjct	<u>4.675.648</u>	CGCAGTGAAAAACATCGC	<u>4.675.631</u>

Figura B3. Blastn dos oligonucleotídeos A, B, C e D desenhados para o mutante Δ RIT3980/81. As numerações sublinhadas correspondem as posições onde cada um dos oligonucleotídeos se anela no genoma da Xac 306 e são crescentes em **A** (4.674.155 – 4.674.173) e **C** (4.674.962 – 4.674.979), onde os dois oligonucleotídeos são diretos (F), enquanto em **B** (4.674.845 - 4.674.828) e **D** (4.675.648 – 4.675.631) são decrescentes, já que os oligonucleotídeos são reversos (R).

A	Query	11	CGGTTTGCTTGCGGACCG	28		B	Query	10	TATGAGCAACGGCAATGGT	28
	Sbjct	<u>4.672.484</u>	CGGTTTGCTTGCGGACCG	<u>4.672.501</u>			Sbjct	<u>4.673.166</u>	TATGAGCAACGGCAATGGT	<u>4.673.148</u>
C	Query	10	ATGCGACCGCTGCCTACC	27		D	Query	10	ACATTGCGCGCCAGGTTG	27
	Sbjct	<u>4.673.409</u>	ATGCGACCGCTGCCTACC	<u>4.673.426</u>			Sbjct	<u>4.674.232</u>	ACATTGCGCGCCAGGTTG	<u>4.674.215</u>

Figura B4. Blastn dos oligonucleotídeos A, B, C e D desenhados para o mutante Δ RIT3979/80. As numerações sublinhadas correspondem as posições onde cada um dos oligonucleotídeos se anela no genoma da Xac 306 e são crescentes em **A** (4.672.484 – 4.672.501) e **C** (4.673.409 – 4.673.426), onde os dois oligonucleotídeos são diretos (F), enquanto em **B** (4.673.166 - 4.673.148) e **D** (4.674.232 – 4.674.215) são decrescentes, já que os oligonucleotídeos são reversos (R).