UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA -UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Michelle Mendonça Pena
Bióloga

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA -UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Michelle Mendonça Pena

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

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

2019

Pena, Michelle Mendonça
P397l Localização subcelular de proteínas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* utilizando proteína repórter / Michelle Mendonça Pena. – – Jaboticabal, 2019
86 p.

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

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

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: MICHELLE MENDONÇA PENA
ORIENTADORA: MARIA INES TIRABOSCHI FERRO
COORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

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

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

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

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

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

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

Jaboticabal, 15 de agosto de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO iii

ABSTRACT iv

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais 1

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 4

2.1 Citricultura: origem, importância econômica e contexto atual 4

2.2 Cancro cítrico: características e implicações na citricultura 6

2.3 Genoma de *X. citri* e proteínas sem função conhecida (hipotéticas) 13

2.4 Uso de microscopia de fluorescência como ferramenta para localização subcelular de proteínas 17

3. REFERÊNCIAS 21

CAPÍTULO 2 – mCherry fusions enable the subcellular localization and pattern differentiation of periplasmic and cytoplasmic proteins in *Xanthomonas* sp. 30

Abstract 30

Introduction 31

Material and methods 32

Bacterial strains, plasmids and culture conditions 32

Details of plasmid construction and genes cloning 33

Fluorescence microscopy 35

Growth curve and pathogenicity assays 35

Western Blotting, Coomassie Blue and qRT-PCR 36

Results 37

The integrative mCherry vector for *X. citri* 37

Stable integration of pMAJIIc into *X. citri* chromosome 37

Subcellular localization of cytoplasmic and periplasmic proteins in *X. citri* 38

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

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

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

Palavras-chave: mCherry, *vrp*A, *gyr*B, *env*C, microscopia de fluorescência, virulência

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

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

Keywords: mCherry, *vrp*A, *gyr*B, *env*C, fluorescence microscopy, virulence

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O mutante do gene XAC0024 (ΔXAC0024), quando inoculado em folhas de Limão Cravo (*Citrus limonia* Osbeck), apresentou diminuição das lesões típicas de cancro cítrico quando comparadas com as lesões causadas pela estirpe selvagem (MARTINS, 2016). No entanto ainda não se sabe a função e local de atuação da proteína codificada por esse gene, sendo sua elucidação de grande importância para a compreensão dos mecanismos moleculares de virulência da bactéria, podendo possivelmente contribuir para a elaboração de novas estratégias de erradicação do cancro cítrico.

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

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

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citricultura: origem, importância econômica e contexto atual

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae (ALVES; MELO, 2003). Dentre as espécies de frutos economicamente importantes para a citricultura, destacam-se as laranjas doces (*Citrus sinensis* Osbeck), as tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), os limões verdadeiros (*Citrus limon* Lush), as limas ácidas tahiti (*Citrus latifólia* Tanaka) e galego (*Citrus aurantifolia* Tanaka) e o pomelo (*Citrus maxima)*, além de outras espécies menos conhecidas (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005; TAZIMA et al.,2008).

Estudos demonstram que os primeiros registros de espécies cultivadas de laranja doce datam de 4.000 anos atrás, sendo seu centro de origem situado no continente asiático, mais precisamente no sul da China e Indonésia (NEVES et al., 2010). Outras espécies de citros, como a laranja azeda e a lima ácida têm a Índia como região de origem (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). A expansão do cultivo de frutas cítricas para os demais continentes está relacionada com o comércio entre as nações e o período de colonização (NEVES et al., 2010).

Bem adaptado às áreas tropicais e subtropicais, favoráveis ao cultivo, os citros apresentam um alto potencial produtivo, sendo considerada um importante “commodity” para o comércio global tanto de frutos frescos como de frutos processados. As principais regiões que se destacam na produção de citros estão situadas nas Américas (liderada pelo Brasil, Estados Unidos, México e Argentina), na bacia do Mediterrâneo (liderada pela Espanha, Itália, Egito e Turquia) e sul e leste da Ásia (liderada pela China, Índia e Japão) (TALON, GMITTER, 2008).

No Brasil, os citros foram introduzidos com a colonização portuguesa em meados do século XVI, com os primeiros pomares possivelmente instalados no Estado da Bahia (DONADIO; MOURÃO FILHO; MOREIRA, 2005). Devido às condições encontras no País para se desenvolver e produzir, a produção de plantas cítricas se expandiu por todo o território nacional; e, a partir daí, a citricultura destacou-se em vários estados (NEVES et al., 2010; LOPES et al., 2011).

O cinturão citrícola brasileiro começou a se estruturar por volta de 1920, com a ideia da criação de uma indústria processadora de suco no interior do Estado de São

Paulo. O aumento contínuo de produção e boa qualidade de frutos, fez com que a indústria se expandisse de forma a iniciar as exportações de frutos para outros países (RODRIGUEZ et al., 1991). Até então, o Brasil tinha os Estados Unidos como forte concorrente e líder do mercado mundial de laranja (NEVES et al., 2010). No ano de 1962, a ocorrência de uma geada nos Estados Unidos, que atingiu as plantações de laranja da Flórida, mudou o cenário da citricultura mundial, colocando o Brasil numa posição privilegiada (NEVES et al., 2010).

Na década de 80, o Brasil consolidou-se como o maior produtor mundial de laranja e, combinando uma citricultura desenvolvida e uma indústria competitiva, o país se mantem nesta posição desde então, seguido atualmente por China, União Europeia, Estados Unidos e México (NEVES et al., 2010; USDA, 2019). A citricultura tem grandes efeitos na formação de capital, na geração de renda, na agregação de valor e no desenvolvimento regional (ZULIAN; DÖRR; ALMEIDA, 2013). O Brasil é o maior produtor e exportador de suco de laranja do mundo, contribuindo com 60% da produção mundial (FRANCO et al., 2016).

O cinturão citrícola, formado por São Paulo e Triângulo Mineiro, é responsável por mais de 80% da produção de laranjas do país (NEVES et al., 2010). O setor citrícola tem um forte impacto na economia dos 350 municípios de São Paulo e Triângulo Mineiro onde a atividade é predominante, gerando em média 200 mil empregos diretos e indiretos e um Produto Interno Bruto (PIB) de US$ 6,5 bilhões em toda a sua cadeia produtiva (NEVES; TROMBIN, 2017).

Dados divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (“United States Department of Agriculture” - USDA) em fevereiro de 2019 mostram um cenário otimista para a safra 2018/2019 de laranjas. Segundo o Departamento, a produção mundial deverá aumentar em até 9%, subindo para 51,8 milhões de toneladas. Desse total, 21,2 milhões serão produzidos por Brasil e Estados Unidos. A produção americana deverá aumentar 41% e a brasileira em 13% (Figura 1). Quanto às exportações de suco concentrado, o Brasil, líder no setor, exportará cerca de 1,21 milhão de toneladas, enquanto o México, segundo colocado no “ranking”, 210 mil toneladas (USDA 2019).

Figura 1: Representação gráfica da produção de laranjas no Brasil para as safras de 2011/12 até 2018/19 segundo dados obtidos pelo “Citrus – World Markets and Trade”, USDA.

Todo esse aumento de produção está relacionado às boas condições climáticas e excelente floração dos grandes pomares brasileiros nos últimos anos, o que impulsionou o mercado. Entretanto, a cultura dos citros tem sofrido com a incidência de diversas pragas e doenças, como o “greening” (“huanglongbing/HLB”), a clorose variegada dos citros (CVC) e o cancro cítrico (GRAHAM et al., 2004; JALAN et al., 2014). Além de ocasionarem grandes perdas econômicas, aumento do custo de produção, a presença do cancro cítrico nos pomares ocasiona restrições de quarentena imediatas, impostas pelas regiões consideradas livres da doença; restrições essas que dificultam o transporte interestadual e internacional de frutas e de materiais vegetais para as áreas sem infestação (GRAHAM et al., 2004; JALAN et al., 2014; FAVARO et al., 2017).

2.2 Cancro cítrico: características e implicações na citricultura

Dentre os problemas fitossanitários que acometem a cultura dos citros, o cancro cítrico é considerado um dos mais agressivos e, por afetar todas as espécies e cultivares comercialmente importantes, tem sido extensivamente estudado por

pesquisadores que buscam soluções eficazes para manejo e erradicação da doença (GRAHAM et al., 2004; JALAN et al., 2014; FAVARO et al., 2017, FERENCE et al., 2018).

Assim como para as plantas cítricas, as informações disponíveis indicam que a região de origem do cancro cítrico foi o Sudeste Asiático, mais precisamente as áreas subtropicais da China, Índia e Indonésia (DAS, 2003), uma vez que lesões de cancro foram observadas em mudas de citros provenientes dessas regiões que estavam depositadas no herbário do “Royal Botanic Gardens”, em Londres (FAWCETT; JENKINS, 1933). Com a dispersão das plantas, a doença também foi disseminada para as regiões produtoras de citros. O Brasil teve seus primeiros relatos de cancro em meados de 1957, no interior do Estado de São Paulo (BITANCOURT, 1957). A partir de então, registros começaram a ser lançados em diversas regiões do país, acompanhando a dispersão e instalação dos pomares de citros (OLIVEIRA et al., 2008).

Pertencente à família Xanthomonadaceae, o gênero Xanthomonas (do grego xanthos: amarelo e monas: entidade), compreende mais de 100 espécies de bactérias, quase que exclusivamente fitopatogênicas. As Xanthomonas possuem aproximadamente 400 hospedeiros, dentre os quais estão espécies economicamente importantes como arroz, pimentão, tomate, cebola, cana-de-açúcar, maracujá e citros (RYAN et al., 2011; ADRIKO et al., 2014). Cada estirpe em particular é limitada a um pequeno número de hospedeiros, tornando esse gênero ideal para os estudos de especificidade nas interações planta-patógeno (BRUNINGS; GABRIEL, 2003).

Bactérias desse gênero apresentam duas formas de colonização; algumas espécies colonizam o espaço intercelular do hospedeiro de forma pontual (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*; *Xanthomonas campestris* subsp. *vesicatoria*; *Xanthomonas oryzae* subsp. *oryzicola*), enquanto outras se espalham sistemicamente através dos vasos condutores do xilema (*Xanthomonas oryzae* subsp. oryzae; *Xanthomonas campestris* subsp. campestres; *Xanthomonas axonopodis* subsp. manihotis) (VERDIER et al., 2004; BUTTNER; BONAS, 2010).

Existem três tipos de cancro cítrico, os quais se diferenciam basicamente pela distribuição geográfica e gama de hospedeiros que são infectados pelos patógenos (STALL; SEYMOUR, 1983). De origem asiática, o tipo A, é causado pela bactéria

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri*) e acomete um grande número de espécies de citros (DA SILVA et al., 2002; DAS, 2003). Os tipos A* e Aw, duas outras estirpes de *X. citri*, são encontradas no sudeste Asiático e Sul da Florida e apresentam patogenicidade limitada a lima ácida “Galego” e “alemow” (Citrus machrophylla) (SCHUBERT et al., 2001; SUN et al., 2004; JALAN et al., 2014). A bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (Xau) é o agente causal das cancroses tipos B (XauB) e C (XauC). Além de serem menos agressivas que as estirpes de *X. citri*, XauB e XauC apresentam distribuição geográfica restrita e limitada gama de hospedeiros. Os isolados de XauB são encontrados na Argentina, no Uruguai e no Paraguai e apresentam patogenicidade restrita a limões verdadeiros e limas ácidas, enquanto XauC é encontrada apenas no Brasil e seus isolados afetam principalmente a lima ácida “Galego” (STALL; CIVEROLO, 1991; KAPP, 2011; JALAN et al., 2014).

As Xanthomonas são bactérias Gram-negativas, bastonetiformes, medindo de 0,4 a 0,7 µm de largura, 0,7 a 1,8 µm de comprimento e que possuem um único flagelo polar. São aeróbias estritas e quimiorganotróficas, pois utilizam fontes de carbono de diversos carboidratos para a obtenção de energia. Sua temperatura ótima de crescimento é de 25ºC a 30ºC e são facilmente isoladas de tecido vegetal infectado. Em meio de cultura artificial, apresentam colônias lisas predominantemente isoladas, viscosas e amarelas, devido à xantomonadina, um pigmento amarelo ligado a membrana e que forma a goma xantana (BRADBURY, 1984; BÜTTNER; BONAS, 2010) (Figura 2- A).

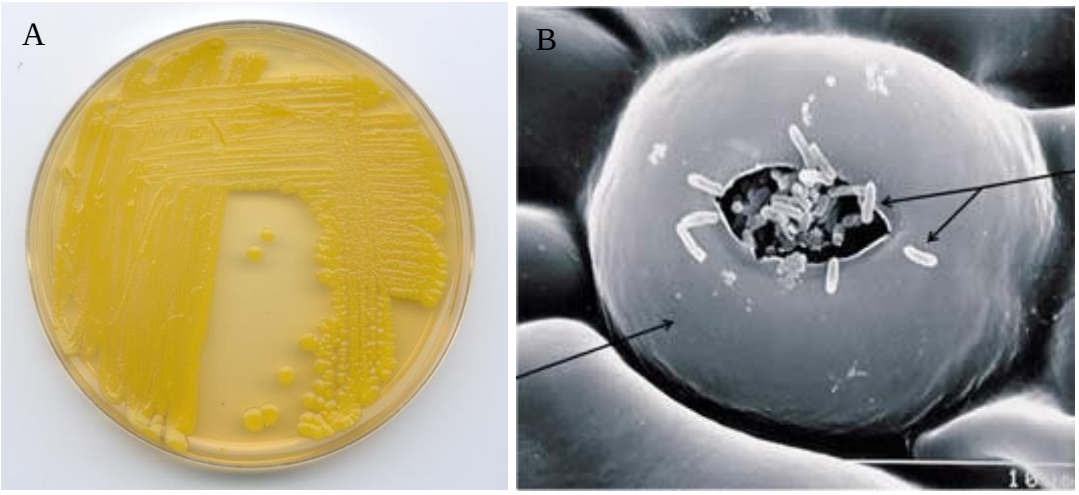


Figura 2: **A**: Colônias de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em meio solido apresentam coloração amarela devido a presença de xantomonadina. **B**: Bactérias emergindo do estômato de uma folha, 5 dias após infecção. Fonte: GRAHAM et al., 2004; https://homepages.wmich.edu/~rossbach/bios312/LabProcedures/luteus%20colonys.jpg.

A transmissão do cancro cítrico não é realizada por um vetor, como em outras doenças bacterianas. A colonização pelo patógeno começa de forma epífita, sem causar doença. Porém, quando as condições ambientais se tornam favoráveis, a *X. citri* pode invadir os tecidos do hospedeiro por meio de aberturas naturais como estômatos e/ ou hidatódios (Figura 2-B), por ferimentos causados pela utilização de equipamentos de colheita e manutenção dos pomares ou mesmo por ação de pragas, como a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton), que deixam ferimentos nas folhas (BROW, 2001; VOJNOV et al., 2001, FUNDECITRUS, 2019).

Entre uma semana a dois meses após a infecção pela *X. citri*, os sintomas da doença podem ser detectados em folhas, ramos e frutos das plantas infectadas, caracterizando-se pela formação de necrose do tecido vegetal, hiperplasia (excessiva divisão celular) e hipertrofia (SCHUBERT et al., 2001; FERREIRA et al., 2017; FERENCE et al., 2018). Nas folhas e frutos observa-se a formação de lesões circulares, com um halo clorótico amarelo, resultado da multiplicação da bactéria e encharcamento do tecido vegetal. Posteriormente, os sintomas evoluem para lesões corticosas salientes de coloração cinza ou marrom-claro tornando-se maiores, mais escuras e ásperas ao toque (BEHLAU; BELASQUE JUNIOR, 2014) (Figura 3).

Figura 3: Sintomas característicos de cancro cítrico em frutos, folhas e ramos. Necroses e lesões eruptivas circundadas por halos cloróticos típicos da doença. Fonte: FUNDECITRUS (https://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7).

Em plantas com infecções severas e/ou em hospedeiros mais susceptíveis, podem ocorrer desfolha e queda prematura dos frutos, ocasionado baixa produtividade e declínio geral das árvores afetadas (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; DAS, 2003; FAVARO et al., 2017; SUNNY; GANDHI, 2018). Por ser uma doença quarentenária, o cancro cítrico gera prejuízos para comercialização de frutos *in natura,* principalmente entre regiões que estão livres da doença (DAS, 2003). A doença ainda não tem cura e sugere-se a utilização de algumas medidas de controle como aquisição de mudas sadias, uso de genótipos de citros resistentes ou menos suscetíveis, implantação de quebra-vento em torno do talhão, controle de pragas, aplicação de cobre e uso de indutores de resistência (FUNDECITRUS, 2019).

Durante muitos anos o cancro cítrico se manteve sob controle nos pomares paulistas, isso porque a legislação vigente até o ano de 2009 era severa e quando detectada a doença no pomar, todas as plantas num raio de 30 metros ao redor do

foco da infecção deveriam ser eliminadas. Porém, quando a contaminação excedia 0,5% do total de plantas, todo o talhão deveria ser eliminado, sendo proibido o plantio de novas mudas no local pelos próximos dois anos (LAIA et al., 2009).

Muitos produtores perderam todo o pomar de laranjas e isso afetou drasticamente a citricultura paulista de maneira que, em novembro de 2013 a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo publicou no Diário Oficial do Estado (DOSP), a Resolução SAA-147, amenizando as regras de controle do cancro cítrico no Estado de São Paulo. Segundo o texto da Resolução 147, a erradicação das plantas situadas em um raio de 30 metros ao redor do foco da infecção não seria mais necessária; em contrapartida, apenas a planta infectada deveria ser retirada e pulverizações com cobre a cada brotação deveriam ser feitas nas demais plantas no raio de 30 metros. Como exigência aos citricultores, os mesmos deveriam realizar as inspeções trimestrais dos pomares e relatórios semestrais deveriam ser enviados à Secretaria de Agricultura (FUNDECITRUS, 2018).

Atualmente, de acordo com a legislação federal, Instrução Normativa nº. 37 de 05/09/2016 (IN37), as estratégias de controle do cancro cítrico, adotadas no Brasil, dependem do status fitossanitário da doença na área, as quais são: 1) Área com Praga Ausente: são os estados da federação sem ocorrência prévia ou presença da doença; 2) Área Livre da Praga (ALP): área específica e definida sem ocorrência da doença em estado onde a doença está presente; 3) Área sob Erradicação ou Supressão: área onde a praga ocorre com distribuição restrita ou em baixa incidência em estado onde a doença está presente; e 4) Área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR): área onde o cancro cítrico está amplamente distribuído entre as plantas em estado onde a doença está presente (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017, FUNDECITRUS, 2019).

No Estado de São Paulo, a Resolução nº. 10 de 20/02/2017 da Secretaria de Agricultura e Abastecimento estabelece o Sistema de Mitigação de Risco como estratégia de controle adotada, permitindo ao citricultor manter as plantas com sintomas de cancro cítrico em seus pomares (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017; FUNDECITRUS, 2019).

No entanto, as estratégias de supressão adotadas para o Estado de São Paulo não têm se mostrado eficazes no controle do cancro cítrico e o cenário da doença para a citricultura não é otimista. De acordo com dados divulgados pelo Fundecitrus

(2019), o percentual das árvores de laranja com sintomas de cancro aumentou 73% entre os anos de 2017 e 2019 (Figura 4). Grande parte das regiões do cinturão citrícola (São Paulo e Minas Gerais) tiveram seus “status” alterados quando comparados com os dados de 2017, 2018 e 2019 para o percentual de árvores afetadas pela doença (Tabela 1).

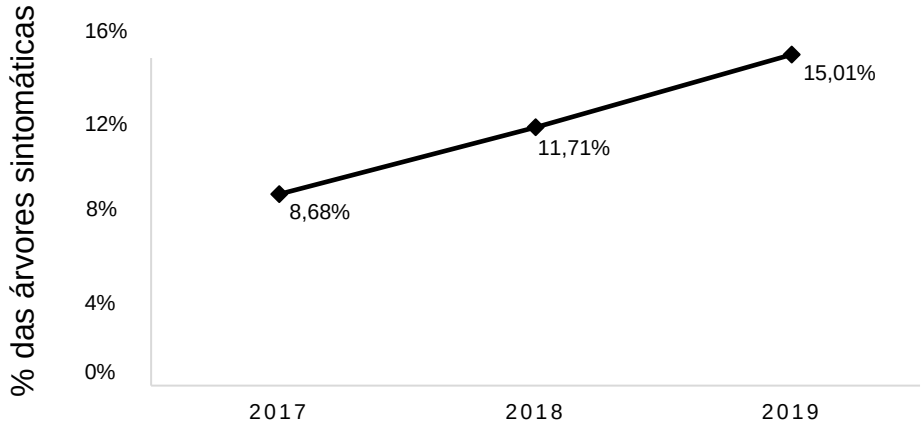


Figura 4: Dados do percentual total das árvores com incidência de sintomas em 2017, 2018 e 2019. Fonte: FUNDECITRUS

Tabela 1: Incidência do cancro cítrico por região do cinturão citrícola

	Ano 2017		Ano 2018		Ano 2019	
Região	**Percentual**	**Nível de severidade**	**Percentual**	**Nível de severidade**	**Percentual**	**Nível de severidade**
Triângulo Mineiro	0,62	Inicial	1,14	Intermediário	4,22	Intermediário
Votuporanga	54,16	Severo	63,14	Severo	71,43	Severo
São José do Rio Preto	11,61	Intermediário	21,76	Intermediário	39,32	Intermediário
Bebedouro	9,08	Intermediário	14,35	Intermediário	24,18	Intermediário
Matão	15,74	Intermediário	26,57	Intermediário	29,13	Intermediário
Duartina	18,79	Intermediário	17,95	Intermediário	18,62	Intermediário
Brotas	3,42	Intermediário	1,58	Intermediário	3,59	Intermediário
Limeira	1,52	Intermediário	1,60	Intermediário	4,05	Intermediário
Avaré	0,18	Inicial	1,96	Intermediário	1,38	Intermediário
Itapetininga	0,58	Inicial	0,03	Inicial	0,38	Inicial
Altinópolis	2,07	Intermediário	0,00	Inicial	0,38	Inicial
Porto Ferreira	1,80	Intermediário	0,13	Inicial	0,66	Inicial

Fonte: FUNDECITRUS, 2019

Toda essa informação disponível sobre o cenário atual do cancro cítrico mostra o quanto a doença pode se espalhar com facilidade e de maneira rápida pelos pomares de laranja. O conhecimento sobre a biologia e forma de interação entre o agente etiológico e o organismo hospedeiro é de extrema importância para a obtenção de estratégias de controle eficazes e que causem menos danos ao meio ambiente, já que o uso excessivo de defensivos à base de cobre metálico, além de ser nocivo ao meio ambiente, pode favorecer o surgimento de isolados resistentes (BEHLAU et al., 2012).

2.3 Genoma de *X. citri* e proteínas sem função conhecida (hipotéticas)

Em 1995, a bactéria Gram-negativa *Haemophilus influenzae* estirpe Rd KW20 teve seu genoma completo sequenciado, marcando o início das pesquisas sobre genômica (SIVASHANKARI; SHANMUGHAVEL, 2006). A partir de então muitos

outros organismos tiveram seus genomas completos sequenciados e publicados, e muitos ainda estão por vir. No entanto, uma vez que os genomas são sequenciados e os potenciais genes previstos, a função de muitos deles não é evidente, mesmo que seus produtos sejam similares a proteínas presentes no genoma de outros organismos, porém sem função conhecida (GALPERIN, 2001).

Para todos os genomas até então publicados, pode-se afirmar que para aproximadamente 50 – 70% dos genes preditos pode-se associar com confiabilidade uma função já conhecida. O restante é caracterizado ou como homólogos a genes já descritos em outros organismos, mas de função ainda desconhecida, sendo denominados como genes “hipotéticos conservados” ou então não possuem nenhum homólogo já descrito, sendo então denominados como “hipotéticos”, “não caracterizados” ou “desconhecidos” (SIVASHANKARI; SHANMUGHAVEL, 2006).

Devido à sua importância econômica, a estirpe 306 da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (anteriormente denominada *Xanthomonas axonopodis* subsp. *citri*) teve seu genoma sequenciado e publicado no ano de 2002 (DA SILVA et al., 2002). Em uma busca por genomas completos disponíveis na base de dados GOLD (BERNAL et al., 2001), é possível encontrar para a família Xanthomonadaceae 164 genomas completos publicados de diversas espécies, porém somente para a espécie *Xanthomonas citri*, 70 genomas estão disponíveis atualmente (Figura 5).

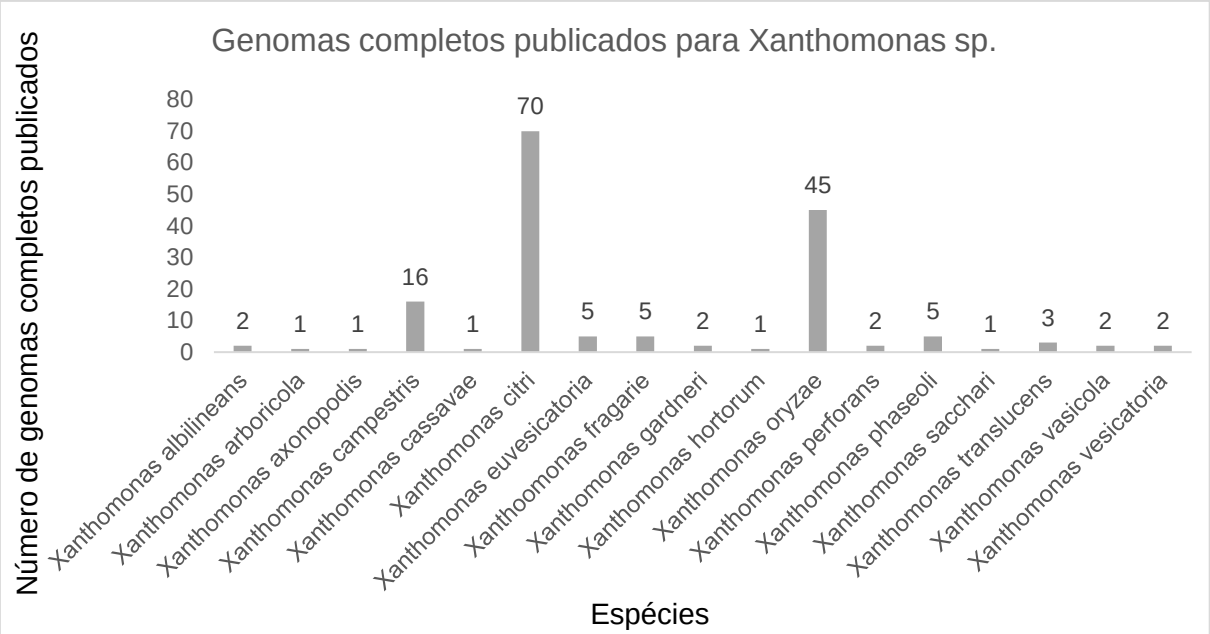


Figura 5: Número de genomas completos publicados para as diversas espécies de bactérias do gênero Xanthomonas. Fonte: https://gold.jgi.doe.gov/

O sequenciamento de *X. citri* mostrou a presença de um cromossomo circular de 5.175.554 pares de bases e dois plasmídeos, pXAC33, com 33.699 pares de bases e pXAC64, com 64.920 pares de bases. A anotação do genoma revelou a presença de 4.313 “quadros de leitura abertos” (do inglês “open reading frames – ORFs) codificando proteínas, das quais aproximadamente 63% foram associadas a proteínas com funções conhecidas em outros organismos e aproximadamente 37% representavam proteínas hipotéticas conservadas ou hipotéticas. Quando analisados os genes (ORFs) de *X. citri*, verificou-se que 40% possuíam similaridade com genes ortólogos de organismos fitopatogênicos, sugerindo que possivelmente estes genes estariam envolvidos nos mecanismos de interação entre a planta e o patógeno (DA SILVA, et al., 2002).

As informações geradas pela publicação do genoma impulsionaram as pesquisas de genômica funcional para o estudo tanto do patógeno quanto de sua interação com o organismo hospedeiro. A quantidade de genes codificantes para proteínas hipotéticas, ou seja, sem função conhecida, chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa, lançando a questão: poderiam essas proteínas hipotéticas

estarem envolvidas no processo de infecção ou mesmo serem proteínas essenciais para a patogenicidade e virulência de *X. citri*?

Quando um gene é anotado como codificando uma proteína hipotética conservada, isto não quer necessariamente dizer que a função deste produto é completamente desconhecida. Se a proteína conservada é encontrada em muitos outros genomas, ela deixa de ser hipotética (GALPERIN, 2001), mas isso não indica a sua função. Muitas proteínas hipotéticas conservadas podem ser preditas como ATPases, GTPases, metiltransferases, metalloproteases, proteínas de ligação ao DNA ou RNA ou transportadores de membrana (ARAVIND; KOONIN, 1999). Isto não significa que a exata função biológica dessas proteínas é conhecida; essa informação só pode ser estabelecida através de experimentação direta (GALPERIN, 2001).

Em 2009, Laia e colaboradores construíram uma biblioteca com 10.000 mutantes viáveis de *X. citri* através da inserção aleatória *in vivo* do transposon Tn5, dos quais 3.300 foram inoculados em folhas de lima ácida Galego para avaliação do fenótipo. Foram encontrados 44 mutantes com a virulência alterada, sendo que 22% tiveram a inserção do transposon em genes que codificam para proteínas hipotéticas. Dentre estes genes, três apresentavam o mesmo domínio catalítico peptidase M23. As peptidases são enzimas que quebram as ligações peptídicas das proteínas e exercem diversas funções fisiológicas de grande importância para o metabolismo celular, desde vírus a vertebrados (TURK et al., 2000; POTEMPA; PIKE, 2005).

Baseado nessa informação, um dos três genes, *XAC0024*, foi selecionado por nosso grupo de pesquisa por codificar uma proteína de 411 aminoácidos contendo um peptídeo sinal composto por 20 aminoácidos, com sítio de clivagem entre os aminoácidos 20 e 21 (MARTINS, 2016). Sabe-se que proteínas que possuem peptídeo sinal estão destinadas e serem transportadas para algum lugar na célula onde desempenham sua função (BRUNINGS; GABRIEL, 2003; BUTTNER; BONAS, 2010; SOARES et al., 2010; RYAN et al., 2011; YAN; WANG, 2011; ZIMARO et al., 2014; ZHOU et al., 2015).

Em estudo realizado por LAIA (2007), o mutante do gene *XAC0024* foi classificado como um mutante cujo *locus* codifica para uma proteína hipotética localizada no envelope celular, porém tanto sua real função quanto sua localização subcelular em *X. citri* ainda não tinham sido elucidadas.

Inúmeras abordagens têm sido empregadas para a predição da função de proteínas usando informações derivadas de similaridade de sequências, perfil filogenético, interações proteína-proteína, complexos de proteínas e perfil de expressão gênica (SIVASHANKARI; SHANMUGHAVEL, 2006), porém novas aplicações para o uso dessas ferramentas precisam ser desenvolvidas.

2.4 Uso de microscopia de fluorescência como ferramenta para localização subcelular de proteínas

A investigação da função das proteínas é de primordial importância no campo das ciências biológicas (NANNI et al., 2010). Uma das características mais significantes, sua localização subcelular *in vivo*, revela informações preciosas acerca do seu comportamento na célula em diversas circunstâncias, possibilitando uma melhor compreensão das suas redes de interação e vias de sinalização (MURPHY et al., 2000; STADLER et al., 2013). Determinar o local de ação de uma proteína pode ser útil para a identificação de drogas que bloqueiem a sua ação (SRINIVASA et al., 2006; KHAN et al., 2011; TAHIR et al., 2011).

Informações sobre a localização subcelular de proteínas têm sido amplamente coletadas ao longo dos últimos anos para diversos organismos (ROLLS et al., 1999; HOJA et al., 2000; SIMPSON et al., 2000; JARVIK et al., 2002; HUH et al., 2003; KOROLEVA et al., 2005). Uma técnica comum é a expressão da proteína de interesse fusionada com uma proteína fluorescente, possibilitando então estudos temporais de sua distribuição na célula viva (STADLER et al., 2013).

Anticorpos também são empregados para localizar proteínas específicas ligadas a organelas, mas seu uso é limitado pois precisam ser específicos para essas proteínas alvo e são ineficazes quando aplicados em sistemas vivos (KENRI et al., 2004). Em contrapartida, proteínas fluorescentes têm a vantagem de não requererem substrato, o que as torna livres de problemas de solubilidade, toxicidade e permeabilidade (ZHANG et al., 2012), porém problemas com perda de fluorescência continuam sendo um grande desfaio (GOODIN et al., 2002).

A microscopia de fluorescência é uma técnica frequentemente usada para determinar a localização subcelular de proteínas, se mostrando eficaz por exemplo,

quando aplicada no diagnóstico de doenças em seus estágios iniciais (TAHIR; KHAN, 2016). Abordagens baseadas em imagens têm a vantagem de fornecer informações espaciais para localização *in situ* de proteínas em uma célula única e pode efetivamente tratar da questão de proteínas que se localizam em múltiplas organelas (STADLER et al., 2013). A tendência é que essa técnica seja cada vez mais aplicada, dada a utilização de proteínas fluorescentes mais estáveis e a automação dos microscópios de fluorescência (GLORY; MURPHY, 2007).

Uma das proteínas repórter mais conhecidas, a Proteína Verde Fluorescente ("Green Fluorescent Protein" - GFP), molécula obtida de uma água-viva (*Aequorea victoria*), é amplamente empregada em estudos de interação proteína-proteína, divisão celular e expressão gênica em uma ampla gama de organismos (KENRI et al., 2004). Desde o primeiro relato do seu uso como um marcador citológico (CHALFIE et al., 1994), o interesse em GFP tem sido considerável; porém, o tipo original dessa proteína fluorescente está longe de ser o ideal.

A GFP apresenta dois picos de excitação, um maior de 395 nm e outro menor de 470 nm e muitos microscópios modernos têm conjuntos de filtros bem desenhados para detectar picos de excitação e emissão de 494 nm e 518 nm, respectivamente. Assim, muitos trabalhos têm utilizado variações do GFP (GFP mutantes) para alterar suas propriedades e tentar adequar aos parâmetros necessários para visualização em microscópio. Embora esses derivativos de GFP têm se provado eficazes para estudos com células eucarióticas, muitos não são ideais para uso em microrganismos por não serem brilhantes o suficiente (LEWIS; MARSTON, 1999).

Um outro problema que limita o uso de fusões de proteínas com GFP está relacionado com o transporte funcional dessa proteína para o periplasma das células (DINH; BERNHARDT, 2011). Quando exportado em uma conformação desdobrada através do sistema SEC, algumas variantes comumente usadas de GFP não se dobram corretamente e tendem a não fluorescer (FEILMEIER et al., 2000).

Há alguns anos foi demonstrado que Proteínas Vermelhas Fluorescentes ("Red Fluorescent Protein" – RFP) não compartilham as mesmas dificuldades de transporte que GFP; assim, essas proteínas poderiam ser eficientemente exportadas para o periplasma através do sistema SEC (CHEN et al., 2005; LEWENZA et al., 2006). Más e colaboradores (2000), publicaram o primeiro trabalho utilizando DsRed em células

de plantas, mostrando a localização nuclear dessa proteína em protoplastos de tabaco. DsRed é uma proteína vermelha fluorescente originalmente encontrada em cnidários (*Discosoma* sp.) que vem sendo empregada com eficiência em estudos tanto em organismos eucarióticos quanto procarióticos (Zhang et al., 2015; RANSON et al., 2015).

Buscando ampliar o leque de opções para estudos de localização intracelular utilizando fusão de proteínas, Shaner e colaboradores (2004) desenvolveram um novo conjunto de proteínas fluorescentes denominado *M-fruit Family* (Figura 7). Através de diversas triagens baseadas em mutações dirigidas, esses pesquisadores desenvolveram variantes da proteína mRFP1 que apresentavam diversos padrões de coloração, variando de amarelo para vermelho, maior tolerância a fusões tanto no -N quanto no -C terminal e melhorias no coeficiente de extinção, rendimentos quânticos e fotoestabilidade.

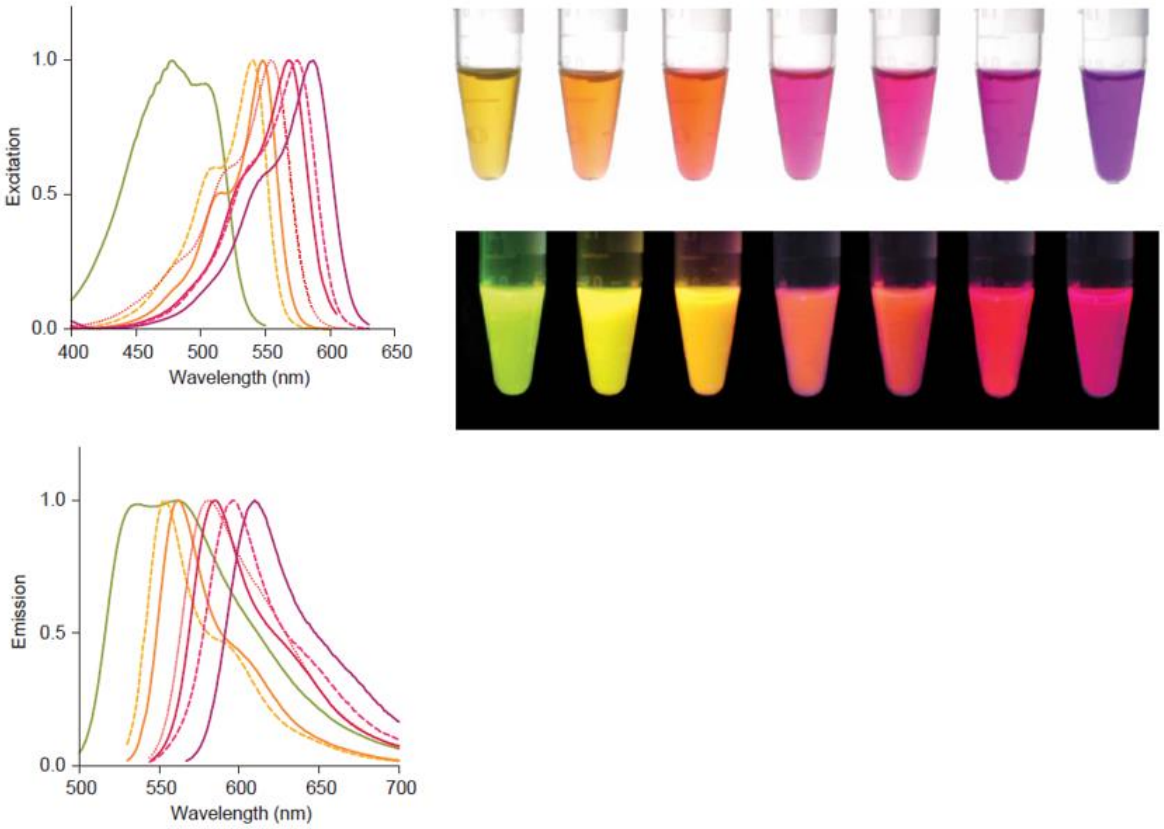


Figura 7: Variantes de RFP (*M-fruit Family*). A e B: Espectro de excitação e emissão para cada uma das proteínas. C e D: Proteínas purificadas (da esquerda para a direita: mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry e mCherry) mostradas em luz visível e fluorescente. Fonte: Shaner et al., 2004.

MCherry foi o último clone produzido dessa família de proteínas fluorescentes, resultando em uma proteína com maior tolerância a fusões no N- ou C- terminal, picos de excitação e emissão de 587 nm e 610 nm, respectivamente, rápida maturação, excelente resistência a pH e uma fotoestabilidade 10 vezes maior que a proteína original mRFP1 (SHANER et al., 2004). Assim, apesar de nenhuma proteína fluorescente ser individualmente perfeita, mCherry tem sido selecionada por diversos pesquisadores como ferramenta de trabalho (DOHERTY et al., 2010; DUELLMAN et al., 2015; RANSOM et al., 2015), sendo nosso grupo de pesquisa o primeiro a utilizar mCherry como proteína repórter para localização subcelular em *Xanthomonas*.

3. REFERÊNCIAS

ADRIKO, J.; MBEGA, E. R.; MORTENSEN, C. N. Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas***. European Journal of Plant Pathology**, v. 138, p. 293–306, 2014.

ALVES, P. R. B.; MELO, B. Cultura dos Citros. **Núcleo de estudo em fruticultura no cerrado**. Universidade Federal de Uberlândia. 2003. Disponível em: <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/citros2.htm>. Acesso em: 23/10/2018.

ARAVIND, L.; KOONIN, E.V. Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. **J. Mol. Biol**., v. 287, p. 1023–1040, 1999.

BEHLAU, F.; BELASQUE JUNIOR, J. Cancro cítrico: a doença e seu controle. Araraquara: **Fundecitrus**, 2014. 82 p. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manuais>. Acesso em: 23/10/2018.

BEHLAU, F.; JONES, J.B.; MYERS, M.E.; GRAHAM, J.H. Monitoring for resistant populations of *Xanthomonas citri* subsp *citri* and epiphytic bacteria on citrus trees treated with copper or streptomycin using a new semi-selective medium. **European Journal of Plant Pathology**, v.132, p. 259–270, 2012.

BEHLAU, F.; SALA, I.; BASSANEZI, R. B. Cancro cítrico: medidas essenciais de controle. 3. ed. Araraquara: **Fundecitrus**, 2017. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manuais>. Acesso em: 23/10/2018.

BELASQUE JÚNIOR, J.; BASSANEZI1, R. B.; SPÓSITO, M. B.; RIBEIRO, L. M.; JESUS JUNIOR, W. C.; AMORIM, L. Escalas diagramáticas para avaliação da severidade do cancro cítrico. **Fitopatologia brasileira**, v. 30, n. 4, p. 387-393, 2005.

BERNAL, A.; EAR, U.; KYRPIDES, N. Genomes OnLine Database (GOLD): a monitor of genome projects world-wide. **Nucleic Acids Res**., v. 29, p. 126–127, 2001. Acesso em: https://gold.jgi.doe.gov/ 10/04/2019.

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

BRADBURY, J. F. Genus II *Xanthomonas*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams & Wilkins, v. 1, p. 199-210, 1984.

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

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

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

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science,** v. 263, p. 802- 805, 1994.

CHEN, S.-C.; ZHAO, T.; GORDON, G.J.; MURPHY, R.F. A novel graphical model approach to segmenting cell images. **Symp. Comput. Intell. Bioinf**. Comput. Biol., 1079, 2005.

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

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

DINH T, BERNHARDT TG. Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 4984-4987, 2011.

DOHERTY, G. P.; BAILEY, K.; LEWIS, P. J. Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation In Bacillus Subtilis. **BMC Research**, 2010.

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C. S. Centros de origem, distribuição geográfica das plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (Ed.). Citros. Campinas: **Instituto Agronômico e Fundag**, p.1-18, 2005.

DUELLMAN, T.; BURNETT, J.; YANG, J. Quantification of secreted proteins using mCherry fusion constructs and a fluorescent microplate reader. **Anal Biochem**, v. 473, p. 34–40, 2015.

FAVARO, M. A.; ROESCHLIN, R. A.; RIBERO, G. G.; MAUMARY, R. L.; FERNANDEZ, L. N.; LUTZ, A.; GARIGLIO, N. F. Relationships between copper

content in orange leaves, bacterial biofilm formation and citrus canker disease control after different copper treatments. **Crop Protection**, v. 92, p. 182-189, 2017.

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

FEILMEIER, B.; ISEMINGER, G.; SCHROEDER, D.; WEBBER, H.; PHILLIPS, G. J. Green Fluorescent Protein Functions as a Reporter for Protein Localization in Escherichia coli. **Journal of bacteriology**. v. 182, p. 4068-4076, 2000.

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

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

FRANCO, A. S. M. O suco de laranja brasileiro no mercado global. **Análise Conjuntural,** v. 38, n. 11, 2016.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Secretaria da Agricultura de São Paulo muda lei de controle de cancro cítrico. In: Comunicação. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias>. Acesso em: 26/10/2018.

FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura). Levantamento de doenças dos citros: HLB, CVC e Cancro cítrico no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste mineiro. Fundecitrus. 2019

GALPERIN, M.Y. Conserved 'hypothetical' proteins: new hints and new puzzles. **Comp. Funct. Genomics**, v. 2, p. 14–18, 2001.

GLORY, E. & MURPHY, R.F. Automated subcellular location determination and high-throughput microscopy**. Developmental cell,** v. 12, p. 7-16, 2007.

GOODIN MM, DIETZGEN RG, SCHICHNES D, RZIN S, JACKSON AO. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. **The Plant Journal**, v. 31, p. 375-383, 2002.

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

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; CUBERO, J.; ACHOR, D.S. Xanthomonas axonopodis pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

HOJA, M.R.; WAHLESTEDT, C.; HOOG, C. A visual intracellular classification strategy for uncharacterized human proteins. **Exp. Cell Res**, v. 259, p. 239–246, 2000.

HUH, W.K. et al. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature** v. 425, p. 686-91, 2003.

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

JARVIK, J.W., FISHER, G.W., SHI, C., HENNEN, L., HAUSER, C., ADLER, S., AND BERGET, P.B. In vivo functional proteomics: mammalian genome annotation using CD-tagging. **Biotechniques**, v. 33, p. 852–867, 2002.

KAPP, J. F. Faixa de hospedeiros de Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii (isolado FDC 1609) patogênica a citrumelo 'Swingle' (Citrus paradisi x Poncirus trifoliata). 2011. 19 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Fundo de Defesa da Citricultura, Mestrado Profissional em Controle de Doenças e Pragas dos Citrus, Araraquara, 2011.

KENRI, T.; SETO, S.; HORINO, A.; SASAKI, Y.; SASAKI, T.; MIYATA, M. Use of Fluorescent-Protein Tagging to Determine the Subcellular Localization of Mycoplasma pneumoniae Proteins Encoded by the Cytadherence Regulatory Locus. **Journal of bacteriology**. v. 186, p. 6944-6955, 2004.

KHAN, A. et al. CE-PLoc: an ensemble classifier for predicting protein subcellular locations by fusing different modes of Pseudo amino acid composition. **Comput. Biol. Chem**., v. 35, p. 218–229, 2011.

KOROLEVA, O.A., TOMLINSON, M.L., LEADER, D., SHAW, P., DOONAN, J.H. High-throughput protein localization in Arabidopsis using Agrobacterium-mediated transient expression of GFP-ORF fusions. **Plant J**., v. 41, p. 162–174, 2005.

LAIA, M. L. Análise funcional de genes de Xanthomonas axonopodis pv. citri. implicados na patogênese. 2007. 344 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2007.

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

LEWENZA, S.; INGIGLIARDI, D. V.; PUGSLEY, A.P. Direct Visualization of Red Fluorescent Lipoproteins Indicates Conservation of the Membrane Sorting Rules in the

Family Enterobacteriaceae. **Journal of bacteriology**, v. 188, p. 3516-3524, 2006.

LEWIS PJ, MARSTON AL. GFP vectors for controlled expression and dual labeling of protein fusions in *Bacillus subitilis.* **Gene** v. 227, p. 101-110, 1999.

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

MARTINS, T. Z. Mutagênese sítio-dirigida da ORF *XAC0024* de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e suas implicações no desenvolvimento do cancro cítrico. Dissertação de Mestrado apresentada ao Progarama de Pós-Graduação em MicrobiologiaAgropecuária da FCAV-UNESP6. 2016.

MAS, P., DEVLIN, P. F., PANDA, S., KAY, S. A. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. **Nature**, v. 408, p. 207–211, 2000.

MOREIRA, L. M.; SOUZA, R. F. de; ALMEIDA, N. F.; SETUBAL, J. C.; OLIVEIRA, J. C. F.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; SILVA, A. C. R. da. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annuals Reviews Phytopathology**, Virginia, v. 42, p. 163-184, 2004.

MURPHY, R.F. et al.Towards a systematics for protein subcellular location: quantitative description of protein localization patterns and automated analysis of fluorescence microscope images. In Proceedings of the Eighth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology**. AAAI Press**, La Jolla/San Diego, CA, USA, p. 251–259, 2000.

NANNI, L. et al. Novel features for automated cell phenotype image classification. Adv. Comput. Biol. Adv. **Exp. Med. Biol**., v. 680, p. 207–213, 2010.

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

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

OLIVEIRA, R. P. de; UENO, B.; SCIVITTARO, W. B.; KOLLER, O. C.; ROCHA, P. S. G. da. Cancro cítrico: epidemiologia e controle. **Embrapa** Clima Temperado. Documentos 23, Pelotas, 2008.

PALAZZO, D. A., MALAVOLTA JÚNIOR, V. A. e NOGUEIRA, E. M. C. Effect of some climatic factors on the index of infection of citrus canker caused of *Xanthomonas campestris pv. citri* on Valencia orange (*Citrus sinensis*) in Bataguassu, MS**.** **Fitopatologia Brasileira**, v. 9, p. 283-290, 1984.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, **Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 627. 2008.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods** v. 8, p. 785-786, 2011.

POTEMPA, J.; PIKE, R. N. (2005). Bacterial Peptidases. In: Concepts in Bacterial Virulence. (Russell W and Herwald H, eds.). Contrib. Microbiology Basel, Karger, v. 12, p. 132-180, 2005.

RAMSOM, E. M.; ELLERMEIER, C. D.; WEISS, D.S. Use of mCherry red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 81, p. 1652-1660, 2015

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

RODRIGUEZ, ODY.; et al. **Citricultura Brasileira**. 2ª. Ed. Campinas, SP, Fundação Cargill, v. 1, p. 492, 1991.

ROLLS, M.M.; STEIN, P.A.; TAYLOR, S.S.; HA, E.; MCKEON, F.; RAPOPORT, T.A. A visual screen of a GFP-fusion library identifies a new type of nuclear envelope membrane protein. **J. Cell Biol**. v. 146, p. 29–44, 1999.

ROSA, J. Distribuição espacial e raio de agregação de cancro cítrico definidos por geoestatística**.** 64 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2010.

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

SHANER, N.C.; CAMPBELL, R. E.; STEINBACH, P. A.; GIEPMANS, B. N. G.; PALMER, A. E.; TSIEN, R. Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discocoma* sp. red fluorescent protein. **Nature Biotechnology** v. 22, p. 1567 – 1572, 2004.

SIMPSON, J.C., WELLENREUTHER, R., POUSTKA, A., PEPPERKOK, R., WIEMANN, S. Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. EMBO Rep. v. 1, p. 287–292, 2000.

SIVASHANKARI, S.; SHANMUGHAVEL, P. Functional annotation of hypothetical proteins – A review. **Bioinformation**, 2006.

SOARES, M. R.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, R. M.; MOREIRA, L. M.; DE OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; MENEGHINI, R.; GOZZO, F. C. Proteome of the phytopathogen Xanthomonas citri subsp. citri: a global expression profile. **BioMed Proteome Science**, v. 8, n. 55, 2010.

SRINIVASA, G. et al. Adaptive multiresolution techniques for subcellular protein location classification. IEEE Int. Conf. **Acoustics Speech Signal Process**, v. 5, p. 14–19, 2006.

STADLER, C.; REXHEPAJ, E.; SINGAN, V. R.; MURPHY, R. F.; PEPPERKOK, R.; UHLEN, M.; SIMPSON, J. C.; LUNDBERG, E. Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. **Nature Methods**, v. 10, 2013.

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

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

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

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

TAHIR, M.; KHAN, A. Protein subcellular localization of fluorescence microscopy images: Employing new statistical and Texton based image features and SVM based ensemble classification. **Information Sciences**, v. 345, p. 65-80, 2016.

TAHIR, M.; KHAN, A., MAJID, A. Protein subcellular localization of fluorescence imagery using spatial and transform domain features. **Bioinformatics**. v. 28, p. 91-97, 2011.

TALON, M.; GMITTER JR., F. G. Citrus Genomics. **International Journal of Plant Genomics**, p. 1-17, 2008.

TAZIMA, Z. H. *et al*. Comportamento de clones de laranja “Valência” na região norte do Paraná. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30 p. 970-974, 2008.

TURK, B.; TURK, D.; TURK, V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. Biochim. Biophys. **Acta**, v. 1477, p. 98-111, 2000.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Citrus: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service. 2019. Disponível em: https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/1j92gk610/tx31qw072/Citrus.pdf

VERDIER, V.; RESTREPO, S.; MOSQUERA, G.; VÉRONIQUE, J.; LOPEZ, C. Recent progress in the characterization of molecular determinants in the Xanthomonas axonopodis pv. manihotis-cassava interaction. **Plant Molecular Biology**, Cali, v. 56, n. 4, p. 573-584, 2004.

VOJNOV, A. A.; SLATER, H.; DANIELS, M. J.; DOW, J. M. Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in Xanthomonas campestris and its regulation in planta. **Molecular Plant–Microbe Interaction**, v. 14, p. 768–774, 2001.

WOOD, R.K.S. Physiological plant pathology come of age. **Annual review of Phytopathology**, 26, 26-40, 1987.

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

ZHANG, S.; ZHAO, B.; LIU, X.; GAO, Z.; HUANG, X. Construction of a new GFP vector and its use for *Fusarium oxysporum* transformation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 23-27, 2012.

ZHANG, Y.; JALAN, N.; ZHOU, X.; GOSS, E.; JONES, J. B.; SETUBAL, J. C.; DENG, X.; WANG, N. Positive selection is the main driving force for evolution of citrus canker-causing Xanthomonas. **The ISME Journal**, v. 9, p. 2128–2138, 2015.

ZHANG, Q.; WALAWAGE, S. L.; TRICOLI, D. M.; DANDEKAR, A. M.; LESLIE, C. A. A red fluorescent protein (DsRed) from *Discosoma* sp. as a reporter for gene expression in walnut somatic embryos. **Plant Caell Rep,** v. 34, p. 861-869, 2015.

ZHOU, X.; HU, X.; LI, J.; WANG, N. A Novel Periplasmic Protein, VrpA, Contributes to Efficient Protein Secretion by the Type III Secretion System in Xanthomonas spp. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Lake Alfred, v. 28, n. 2, p. 143-153, 2015.

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

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

CAPÍTULO 2 – mCherry fusions enable the subcellular localization and pattern differentiation of periplasmic and cytoplasmic proteins in *Xanthomonas* sp.

M. M. Pena[1], D. Teper[2], N. Wang[2], M. I. T. Ferro[3], K. U. Sato[4], J. A. Ferro[3#]

[1]São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Agricultural and Livestock Microbiology Graduation Program, Jaboticabal, SP, Brazil

[2] Department of Microbiology and Cell Science, Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred, U.S.A

[3] São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Department of Technology, Jaboticabal, SP, Brazil

[4]São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Department of Biochemistry and Microbiology, Rio Claro, SP, Brazil

jesus.ferro@unesp.br

Abstract

Fluorescent markers are a powerful tool and have been widely applied in biology with different purposes. The genome of *Xanthomonas citri* subsp *citri* (*X. citri*) published many years ago revealed that approximately 30% of the genes encode hypothetical proteins. Elucidating and characterizing their subcellular localization and functions are an important strategy to understand the host pathways and mechanisms involved in plant-host interaction. We have constructed an integrative vector, pMAJIIc, for the expression and localization of red fluorescent protein (mCherry) fusions in *X. citri.* Fluorescence microscopy was used to track the localization of VrpA protein, which was visualized surrounding the bacterial outer membrane, and GyrB, which showed a diffused cytoplasmic localization, sometimes with dots accumulated near the cellular poles. Integration of the vector into the *amy* locus of *X. citri* did not affect the bacterial virulence. The vector could be stably maintained in *X. citri*, and the disruption of *α-amylase* gene provided an ease screening method for the transformant colonies. Evaluation of mCherry expression confirmed that the proteins show fluorescence only with the addition of arabinose in the medium. The results demonstrate that mCherry

vector is a powerful tool and can be used efficiently for protein localization in cytoplasmic and periplasmic environments.

Keywords: red fluorescent protein, *gyr*B, *vrp*A**,** bacteria

Introduction

Xanthomonas citri sbsp *citri* (*X. citri*), is a gram-negative, rod-shaped pathogenic bacterium that cause Asiatic citrus canker (ACC) in Rutaceous plants (BRUNINGS; GABRIEL, 2003). ACC is one of the most serious problems to citrus industry and since it was detected in the Northern Hemisphere, several protocols of eradication have been applied to suppress the bacteria spread (BEHLAU et al., 2016). Although there is no effective treatment, the eradication of symptomatic trees combined with copper-based bactericides spray is one of the control methods (GOTTWALD et al., 2002; BEHLAU et al., 2012), but still insufficient to keep the citriculture free of the disease.

One of the most powerful strategy to defeat a phytopathogen disease is to understand the mechanism used by the pathogen to break down the host defense barriers. *X. citri* had its fully genome published many years ago (da SILVA et al., 2002), and since then a strong effort has been made to understand the molecular pathways used by this bacterium during the infection process (LI et al., 2013; ZHOU et al., 2015; ABE; BENEDETTI, 2015; ORCE et al., 2016). The elucidation of the type III secretion system (T3SS), the most important apparatus used by *X. citri* during citrus canker development (ZIMARO et al., 2014) is an example of how the bacterium deliver avirulence proteins into the host cells. The role of these avirulence proteins and its cellular localization is a powerful information to understand the bacteria biology and to develop potential antimicrobials.

Although there are many ways to characterize the function of a gene, new tools need to be developed to improve and make the characterization more accurate. Protein function could be investigated and elucidated in part by fusing them with fluorescent proteins with subsequent determination of their subcellular localization (GOODIN et al., 2002). Fluorescent proteins have the advantage that they do not require a substrate, which make those proteins free of solubility, toxicity or permeability

problems (ZHANG et al., 2012); however, sensitivity to photobleaching is still a big challenge (GOODIN et al., 2002). One of the first works using fluorescent protein as a cytological report was done using green fluorescent protein (GFP) (CHALFIE et al., 1994); however, problems with the export of functional GFP to the periplasmic region have been reported (DINH; BERNHARDT, 2011). Alternatively, other fluorescent proteins, like mCherry, have been developed, which displayed correct folding and function in the periplasmic region (SHANER et al., 2004; DINH; BERNHARDT, 2011). MCherry is a monomeric red fluorescent protein with an excitation/emission wavelength at 587/610nm, respectively. This protein is a homolog derived from DsRed, originally isolate from *Discosoma* sp. (cnidarian) and has been widely applied to fused protein localization in prokaryotes and eukaryotes (RAMSOM et al., 2015; DUELLMAN et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Here we report on the construction of an integrative vector, pMAJIIc, with a distinguishable fluorescent marker – mCherry – that can be used for fused protein localization in *Xanthomonas* sp. periplasm. Fluorescence emission could be easily differentiated in *X. citri* cells and the bacterial micrography allowed the visualization of its cytoplasmic and periplasmic proteins. The pMAJIIc vector is stable and does not affect the bacterial development, virulence or pathogenicity.

Material and methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions

The strains and plasmids used in the present work are listed in Table 1. The *Escherichia coli* (*E. coli*) strains (DH10B and HST08 - Stellar) used for cloning were cultivated in SOB and LB/ LB-agar (SAMBROOK et al., 1989) at 37°C. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) strain 306 were cultivated at 30ºC in NB medium (“Nutrient Broth”: meat extract 3g/L and peptone 5g/L) or on NB-agar plates (NA, 15g/L) supplemented with L-arabinose (0.05% w/v) and starch 0.2% (w/v) when required. The antibiotics carbenicillin and kanamycin, when required, were used at the concentration of 50μg/mL.

Table 1. List of strains and plasmids.

Strains	**Characteristics**	**References**
X. citri	Wild-type strain 306	IBSBF 1594; Da Silva et al., 2002
E. coli DH10B	Cloning strain	Laboratory Stock
E. coli Stellar	Cloning strain	Takara
Plasmids	**Characteristics**	**References**
pSG1194	*lacZ*; mCherry expression vector; $Ap^{R;}$ Cp^{R}	Feucht; Lewis, 2001
pGCD21	*araC*-p*ara-gfpmut1*; *amy*106-912 Ap^{R}; Km^{R}; integrative vector in *X. citri*	Lorenzoni et al., 2017 (GenBank KU678206)
pMAJIc	Derivative from pGCD21, mCherry expression vector; Ap^{R}; Neo^{R}/Km^{R}; *ara*C-p*ara;* integrative vector in *X. citri*	This work
pMAJIIc	Derivative from pMAJ1; polylinker;	This work

Ap^{R}: ampicilin resistance, Cp^{R}: chloramphenicol resistance, Km^{R}: kanamycin resistance, Neo^{R}neomycin resistance

Details of plasmid construction and genes cloning

The coding sequence for mCherry was PCR amplified from plasmid pSG1194 (FEUCHT; LEWIS, 2001) using the primers mCherryF/R (all oligonucleotides are listed in Table S1), digested using the enzymes *Xho*I and *Not*I and ligated into pGCD21 plasmid (LORENZONI et al., 2017) digested with the same enzymes, giving rise to plasmid pMAJIc (this work).

To improve the cloning possibilities, extra restriction sites (polylinker) were designed and inserted into pMAJIc previously digested with *Nhe*I and *Xho*I. For this, equal molar amounts of oligonucleotides pMAJ1_PL-F/R were dissolved in 100μL TE buffer (10:0.1), heated to 94ºC for 2 minutes and gradually cooled. After the annealing, the polilynker was inserted into pMAJIc generating pMAJIIc (this work; Figure 1). All the constructions were checked by DNA sequencing.

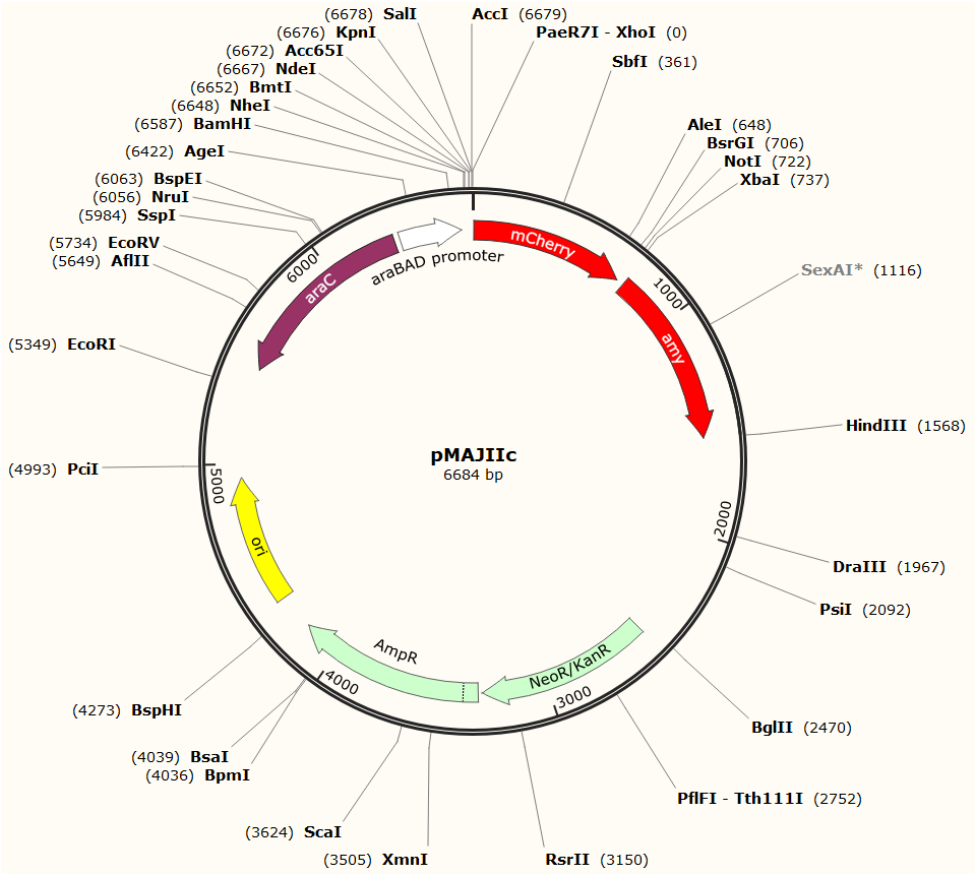


Figure1: Map of the integrative vector pMAJIIc showing the relevant features and cloning sites. *Ori,* origin of plasmid replication; *ap, neo* and *kan*, ampicillin, neomycin and kanamycin resistance, respectively; *amy*, *amy* DNA fragment (106-912) of *X. citri*; *mCherry*, fluorescent protein; *araC*, the arabinose repressor; pBAD the arabinose promoter. The polylinker is composed by *Nde*I, *Kpn*I and *Sal*I restriction sites comprised between the *Nhe*I-*Xho*I region. Unique restriction sites are shown in bold letters.

Two genes from *X. citri* (cytoplasmatic – *gyr*B and periplasmatic – *vrp*A) were selected, amplified using the primers gyrB_IF_F/R and VrpA_IF_F/R, respectively, and cloned into pMAJIIc previously digested with *Xho*I using the *In-Fusion HD Cloning Kit* (Takara Bio USA, Inc.), as recommended by the manufacturer. The plasmids constructions (*X. citri* pMAJIIc-gyrB and *X. citri* pMAJIIc-vrpA) as well as the empty plasmid (*X. citri* pMAJIIc) were first transformed into *E. coli* Stellar chemically competent cells (Invitrogen), followed by plasmid extraction and *X. citri*

electrotransformation (SAMBROOK et al., 1989; do AMARAL et al., 2005). The cloning was checked by agarose gel of PCR product and DNA sequencing.

The plasmid pMAJIIc harbor an *X. citri amy* locus fragment (bases 106-912) which allows the integration into *X. citri* chromosome by disrupting the gene. To confirm the integration and stability of the vector, the mutant bacteria (*X. citri* pMAJIIc, *X. citri* pMAJIIc-gyrB and *X. citri* pMAJIIc-vrpA) were selected on NA plates supplemented with 0,2% of soluble starch followed by crystals iodine vapor exposure (MARTINS et al., 2010). The stability was confirmed by keeping a continuous liquid bacterial culture without any antibiotic supplementation for seven days. For that, every day one milliliter from the overnight grown culture were transferred to a new Erlenmeyer with four milliliters of fresh NB medium; by the last day, the starch degradation assay was performed.

Fluorescence microscopy

Bacteria were cultivated in NB medium for approximately 16 hours at 30^{oC} and 200 rpm. The cultures were adjusted to OD_{600nm}~ 0.1 with NB medium and grown in the same conditions until OD_{600nm}~ 0.3. Arabinose 0.05% was added to the medium and after the minimum of two hours induction, drops of 5µL of cell culture were placed on microscope slides covered with a slide cover slip as described by MARTINS et al. 2010). Bacteria were immediately visualized using an Olympus BX61 microscope equipped with a monochromatic OrcaFlash2.8 camera (Hamamatsu, Japan) and TxRed filter. Data collection and analyzes were performed with the software CellSens Version 11 (Olympus).

Growth curve and pathogenicity assays

X. citri wild-type and mutant (*X. citri* pMAJIIc) were cultivated in NB medium for 16 h at 30^{oC} and 200 rpm. For in vitro growth curve, cultures were diluted in fresh NB medium to an OD_{600nm} of ~ 0.1 in a final volume of 1.5 mL. Cell cultures were distributed in the wells of a 24-wells microtiter plate and incubated in a microtiter plate reader (Synergy H1M1; BioTek) at 30^{C} with constant agitation (200 rpm) and OD_{600nm} were

measured every 30 min for 20 hours (LACERDA et al., 2017). For in plant growth curve; cultures were adjusted to OD_{600nm} of ~ 0.002 by dilution using $MgCl_2$ (10mM) and inoculated into the abaxial Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) leaves using a needless siring. Bacteria were recovered using $1cm^2$ leaf discs from the inoculation point at 0, 3, 6 and 9 DAI (day after inoculation) and plated on NA medium with serial dilution for colony count.

The pathogenicity tests were performed in triplicate using hosts with different susceptibility levels for *X. citri*: Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*), Hamlin sweet orange (*Citrus sinensis*), Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and Rangpur lime (*Citrus limonia*). Bacterial cells (*X. citri* pMAJIIc and *X. citri* wild-type) were adjusted to 10^6 CFU mL^{-1} using NaCl (0,9%) and inoculate as well as a negative control (NaCl 0,9%) on the leaves abaxial surface using a hypodermic syringe of 1.0 mL without needle (for *X*. *citri*, an OD_{600nm} equal to 0.3 corresponds to 10^6 CFU mL^{-1}). Symptoms were observed for two weeks and the photos were taken at the 15^{th} day after inoculation.

Western Blotting, Coomassie Blue and qRT-PCR

The expression of mCherry was evaluated by Western blot and qRT-PCR analysis using *X. citri* carrying the pMAJIIc plasmid. *X. citri* cells (*X. citri* pMAJIIc and *X. citri* wild-type*)* were cultivated in NB medium supplemented with arabinose 0.05% and NB medium without supplementation. Total protein extracts were prepared by growing 3.0 mL of bacteria cultures for 16h. The bacterial cells from 3.0 mL of each culture were pellet by centrifugation (13000 rpm, 1 min in a microfuge) and 300µL of Laemmli Buffer were added for each sample, heated at 95^C for 10 minutes and 30µL were loaded onto two SDS-PAGE gels prepared following the instruction of TGX™ FastCast™ Acrylamide Solutions kit (BIO-RAD).

For protein visualization, one gel was stained with Bio_safe™ Coomassie G250 (BIO-RAD) for 30 minutes and destained for ~ 16 hours in distilled water; and for the Western blotting assay the other gel was eletroblotted onto a nitrocellulose membrane, washed with distilled water and incubated for ~ 2 hours with 5% non-fat milk in TBS (BIO-RAD). The polyclonal anti-mCherry primary antibody raised in rabbits (Bb pAb to mcherry 1:1000 abcam) was then added and incubated for ~ 16 hours in a cold-room.

After the incubation the membrane was washed three times with TBS and the primary antibody was detected with anti-rabbit immunoglobulin raised in goat (goat pAb to Rb IgG HRP – abcam). Antibody detection and chemiluminescent reaction were performed according SuperSignal™West Dura Extend Duration Substrate Kit (Thermo Fisher).

X. citri total RNA was extract using TRIzol™ (Thermo Fisher) and the first strand of complementary DNA was synthesized from 1µg of total RNA using a qScript® cDNA SuperMix (Qiagen). Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems) was used to design the primers for the mCherry gene and for the endogenous *gyr*A gene used as control. The quantitative reverse transcription real-time PCR (qRT-PCR) was performed using SYBR Premix (Takara) and was run on a QuantStudio™ 3D Digital PCR System and the relative quantification was calculated using the Pfaffl method (PFAFFL, 2001).

Results

The integrative mCherry vector for *X. citri*

The vector harbors a fragment of the *α-amylase* gene (*amy* bases 106-912), which mediate the integration and allows a single copy into the bacterial chromosome, meaning that the vector does not replicate in *X. citri*. It carries the arabinose promoter (pBAD) and its regulatory gene *araC*, a mCherry coding sequence and unique restriction sites for in-frame N- or C- terminal mCherry-protein fusions (Figure 1).

Stable integration of pMAJIIc into *X. citri* chromosome

X. citri mutant strains were screened on NA plates supplement with starch. Since the integration disrupted the *α-amylase* gene, the mutants are unable to degrade starch (Figure 2). Three colonies of *X. citri* 306 wild-type strain was placed onto the top surface of the NA petri dish, and a clear white halo was formed for all the three colonies. On the other hand, the mutant strains colonies were deficient in starch degradation, a phenotype that confirms the integration into *amy* locus. To ensure that the integration

into *X. citri* chromosome is stable, the mutant *X. citri* pMAJIIc were cultivated during seven days in NB medium without antibiotic addition. The bacteria were screened on NA plates supplement with starch and the same phenotype were observed, with no halo formation surrounding the colonies (data not shown)

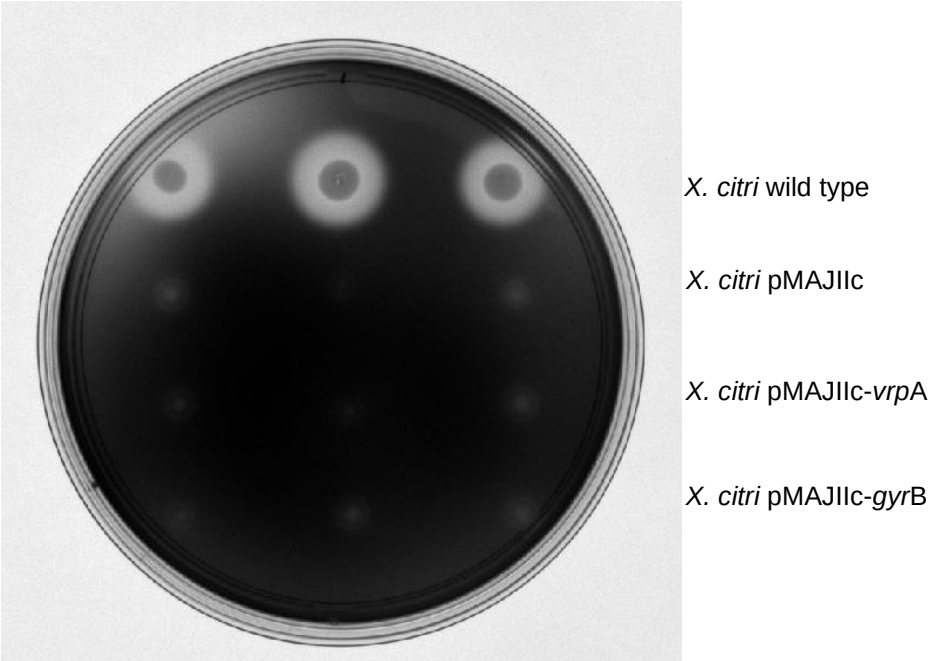


Figure 2: Starch degradation by *X. citri* 306 wild type and mutants. *X. citri* wild type produces a clear white halo, indicating the starch was degraded. The pMAJIIc vector integration into *X. citri* chromosome produces mutants uncappable to degrade starch, resulting in no white halo formation around the colonies. Halo were visualized by exposing the plate to iodine vapor and three different colonies of each wild type or mutant were plated as replicates.

Subcellular localization of cytoplasmic and periplasmic proteins in *X. citri*

The functionality of mCherry expression vector was tested by using the genes *gyr*B and *vrp*A, which local of action were already well characterized in *X. citri*. Bacteria cells showed different mCherry fluorescence emission pattern for all the constructions (*X. citri* pMAJIIc, *X. citri* pMAJIIc -*gyr*B and *X. citri* pMAJIIc -*vrp*A) (Figure 3).

The *X. citri* pMAJIIc (empty vector) showed a strong and uniform fluorescence emission, with the fluorescent signal spread all over the cytoplasm (Figure 3B-C). Regarding the pMAJIIc - *gyr*B construct, a fluorescent signal was observed colocalized

with the chromosome within the cell and sometimes forming a discrete focus near the cell pole. Different from the fluorescence pattern showed in the empty vector, the cells' outer membrane in the red channel was unclear (Figure 3E) and could only be identified in the phase and merge cell (Figure 3D and F).

For pMAJIIc -*vrp*A, the fluorescence could be observed spread around the cell edges, while the cytoplasm remained non-fluorescent (Figure 3H-I). Comparing the mCherry emission from this construction with the cytoplasmic one, the cells' shape in the red channel was clear and easy to be visualized (Figure 3H).

A quantitative evaluation of 200 individuals' cells were made in order to measure the cells' length for each culture (*X. citri* pMAJIIc, *X. citri* pMAJIIc -*gyr*B and *X. citri* pMAJIIc -*vrp*A) (Table 2). *X. citri* cells displayed a normal length based on the size described by Bradbury (1984). *X. citri* pMAJIIc, *X. citri* pMAJIIc -*gyr*B and *X. citri* pMAJIIc -*vrp*A showed an average cell length of 1.52 ± 0.36 µm, 1.80 ± 0.41 µm and 1.79 ± 0.38 µm, respectively.

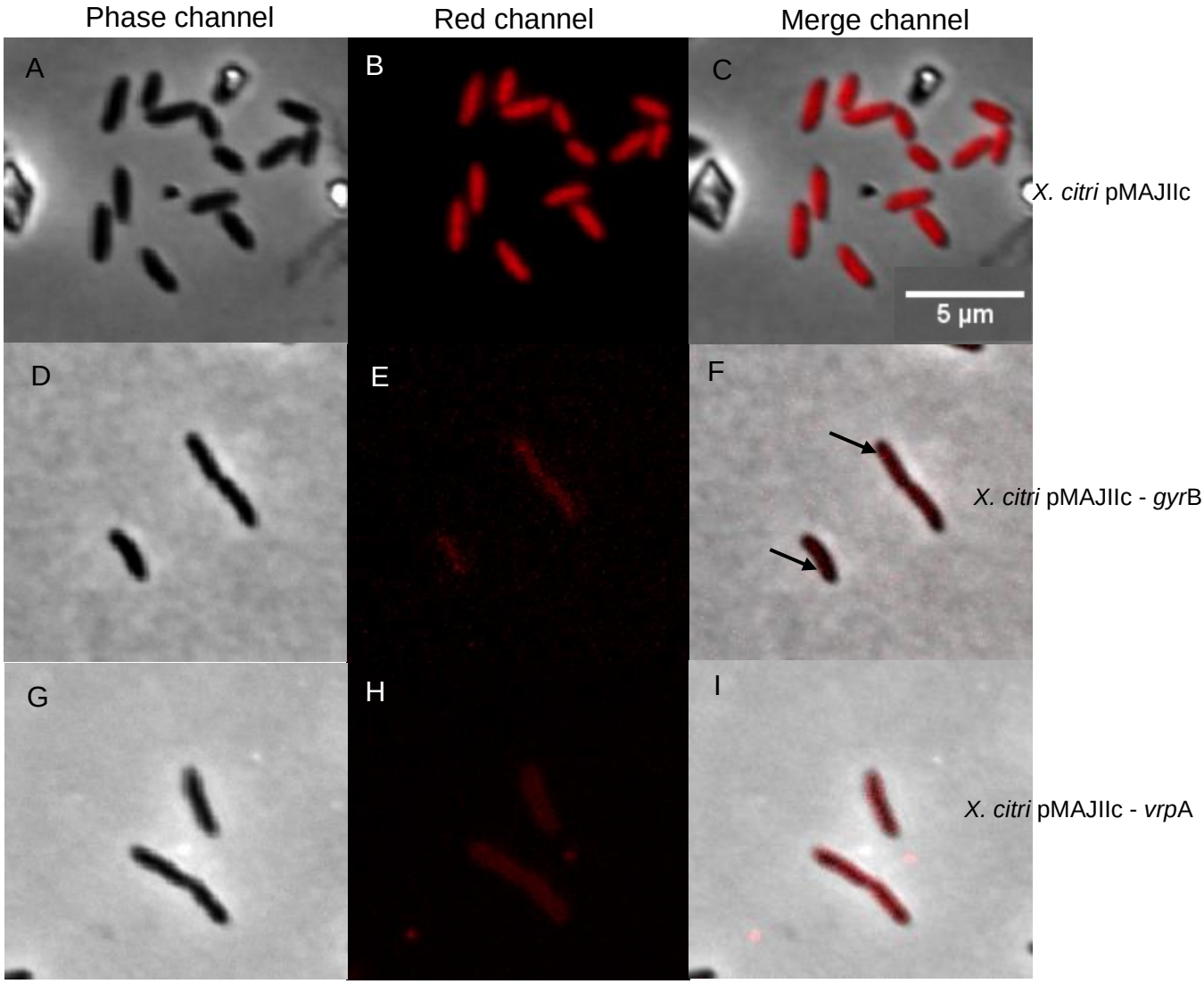


Figure 3: Subcellular localization of *X. citri* pMAJIIc, pMAJIIc - *gyr*B and pMAJIIc -*vrp*A expressing the florescent protein mCherry and the fluorescent proteins fusions. The figure shows the phase contrast, TxRed and overlay of the two filters, respectively for each construction. A-C: *X. citri* pMAJIIc (empty vector), D-F: *X. citri* pMAJIIc – *gyr*B and G-I: *X. citri* pMAJIIc -*vrp*A. The site of *X. citri* pMAJIIc – *gyr*B accumulation is pointed out with a black arrow (magnification of x 1000).

Table 2: Morphological analysis of *X. citri* construction according to cell length

	Cell length (*n* = *200*), µm
X. citri pMAJIIc	1.52 ± 0.36[a]
X. citri pMAJIIc -*gyr*B	1.80 ± 0.41[b]
X. citri pMAJIIc -*vrp*A	1.79 ± 0.38[b]

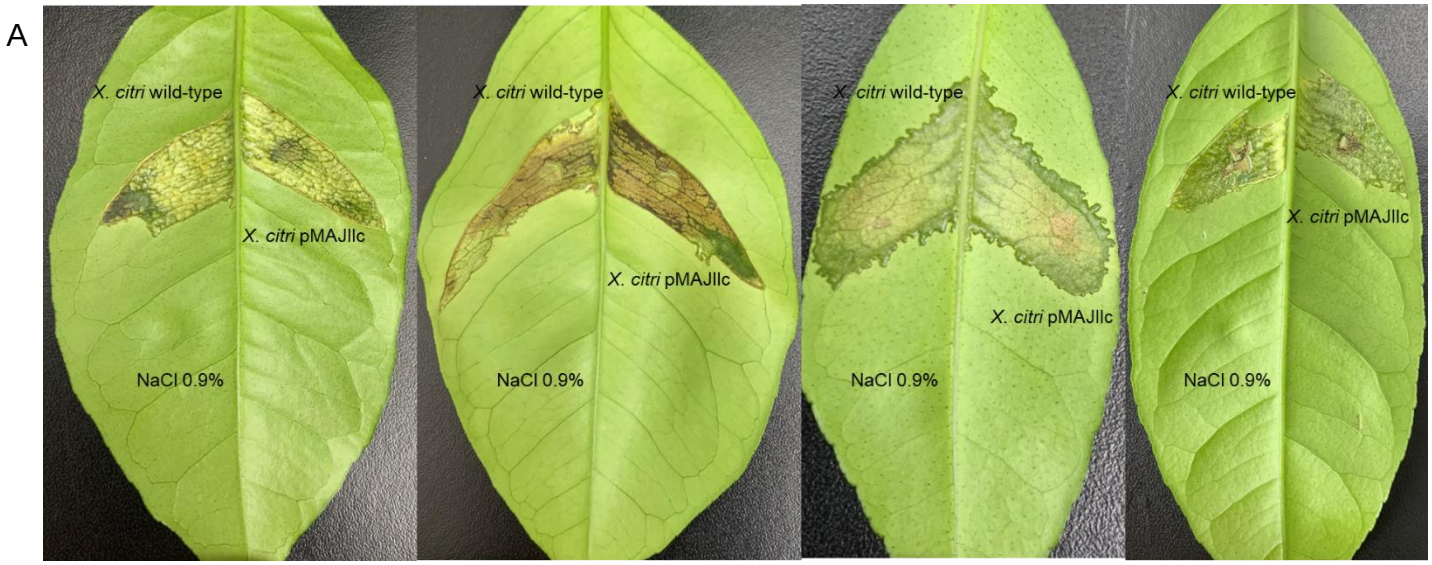
Data correspond to the average cell length ± standard deviation. Same letters meaning no significant difference according to *Tukey test* - 0.05.

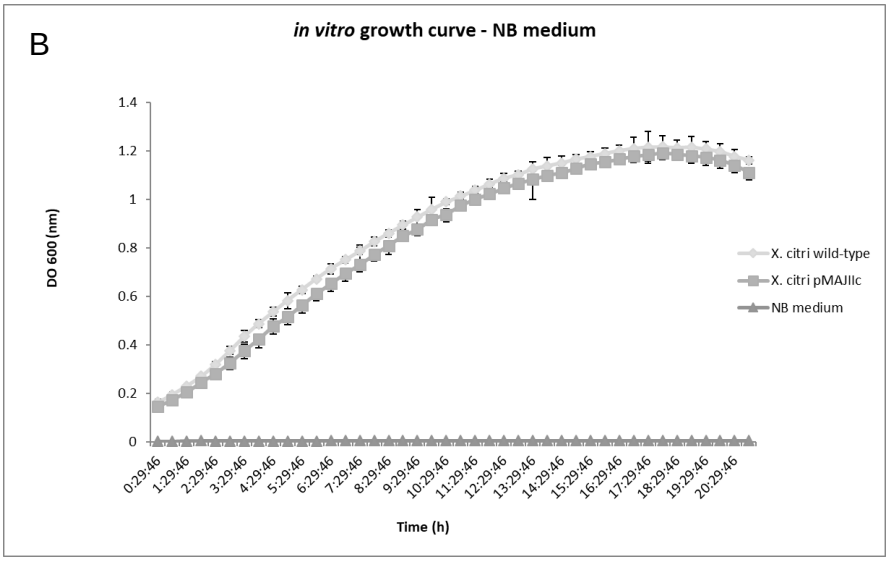
Integration into *X. citri* chromosome does not affect bacteria pathogenicity and viability

No variation in canker symptomatology were observed between the strains *X. citri* pMAJIIc and *X. citri* wild-type in the different hosts (Figure 4A). The symptoms observed 15th day after inoculation showed the borders and brownish lesions, typical canker citrus disease patterns in both *X. citri* wild-type (positive control) and *X. citri* pMAJIIc construction. In contrast, the area inoculated with NaCl 0.9% (negative control) did not show any damage to the leaves. These results clearly demonstrate that plasmid pMAJIIc integration did not change the bacteria phenotype and that the capability to cause citrus canker remained unaffected.

In addition, *in vitro* and *in planta* growth curves were performed to evaluate the growth capability of *X. citri* pMAJIIc strain in comparison with the *X. citri* wild-type (Figure 4B and C). The *in vitro* growth curve showed that both strains grown equally along the time with no difference between *X. citri* pMAJIIc and *X. citri* wild-type bacteria (Figure 4B). According to the curve, both strains follow the same lag and log- phases and by the 17th hour started the declined phase.

For the *in planta* assay, plant disks were collected from inoculated leaves for both strains, and plated in NA medium after serial dilutions. *X. citri* pMAJIIc and *X. citri* wild-type strains showed similar development *in planta* with no significant difference in colonization (Figure 4C). Different from the *in vitro* growth curve, the strains showed a shorter lag and log phases, showing a stable grown after the 6th day after inoculation. Together, these results confirm that *X. citri* pMAJIIc can cause disease as *X. citri* wild-type and the plasmid construction is functional for the characterization of genes involved in virulence and pathogenicity.





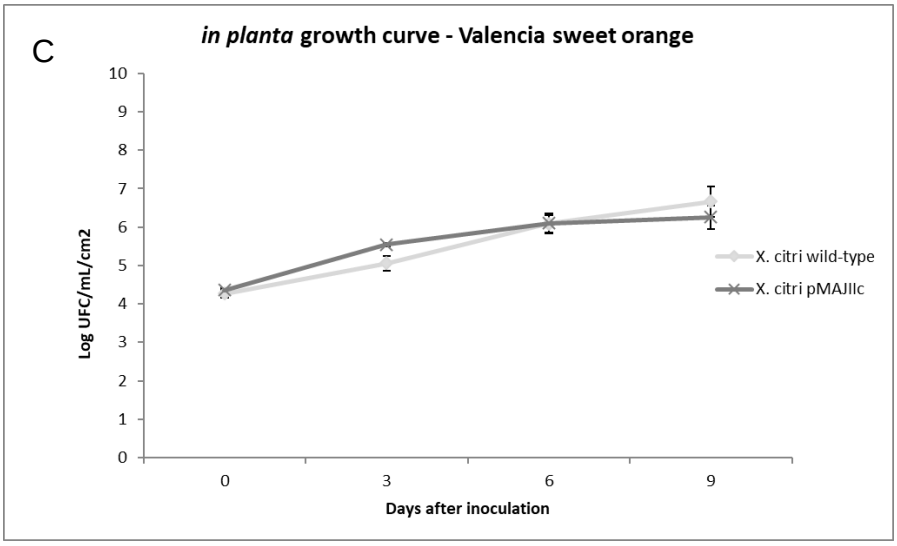


Figure 4: Pathogenicity assay and growth curves for *X. citri* wild type and *X. citri* pMAJIIc. Canker symptoms can be visualized after 15 days of plant inoculation. The plasmid integration does not affect the bacteria growth in orange leaves or NB medium. A1: Valencia sweet orange leaf; A2: Hamlin sweet orange leaf; A3: Mexican lime leaf; A4: Rangpur lime leaf. The mutant and wild-type strains were inoculated using a hypodermic syringe on the abaxial leaf surface. B: *in vitro* growth curve. *X. citri* pMAJIIc and *X. citri* wild type were cultivated in NB medium and the OD_{600nm} were measured for 20 hours. C: *in planta* growth curve. Leaves disks were collected from Valencia sweet orange at 0, 3, 6 and 9 days after inoculation and the bacteria development were evaluated after grown in NA medium plates. Tests were carried out in triplicate.

Effect of arabinose on the expression of mCherry under control of *ara*BAD promoter

The expression of mCherry under the control of arabinose promoter was evaluated in *X. citri* pMAJIIc by Western blot and qRT-PCR. For the Western blotting, six single colonies of *X. citri* pMAJIIc harboring the expression cassette were cultivated in NB medium and, for three of them, 0.05% arabinose were added to induce the mCherry production. *X. citri* wild-type strain were used as control, and like the *X. citri* pMAJIIc strain, were cultivated in NB medium with and without arabinose supplementation. A band of the expected size for mCherry (~29 kDa) was clearly detected for the three *X. citri* pMAJIIc samples treated with arabinose (Figure 5A, lanes 7, 8 and 9). No band could be visualized neither for the *X. citri* pMAJIIc untreated with arabinose (Figure 5A, lanes 4, 5 and 6) nor for *X. citri* wild type (Figure 5A, lanes 2 and 3). The bands above the mCherry mark represent nonspecific interactions of the polyclonal antibody. The qRT-PCR were also performed to analyze the transcription level of mCherry in *X. citri* pMAJIIc using the arabinose inductor (Figure 5B). As expected, the mRNA was only produced when arabinose was added to the medium. Taking together, these results confirm that there is no leakage for *X. citri* pMAJIIc and the expression of the mCherry cassette is completely controlled by the *ara*BAD promoter.

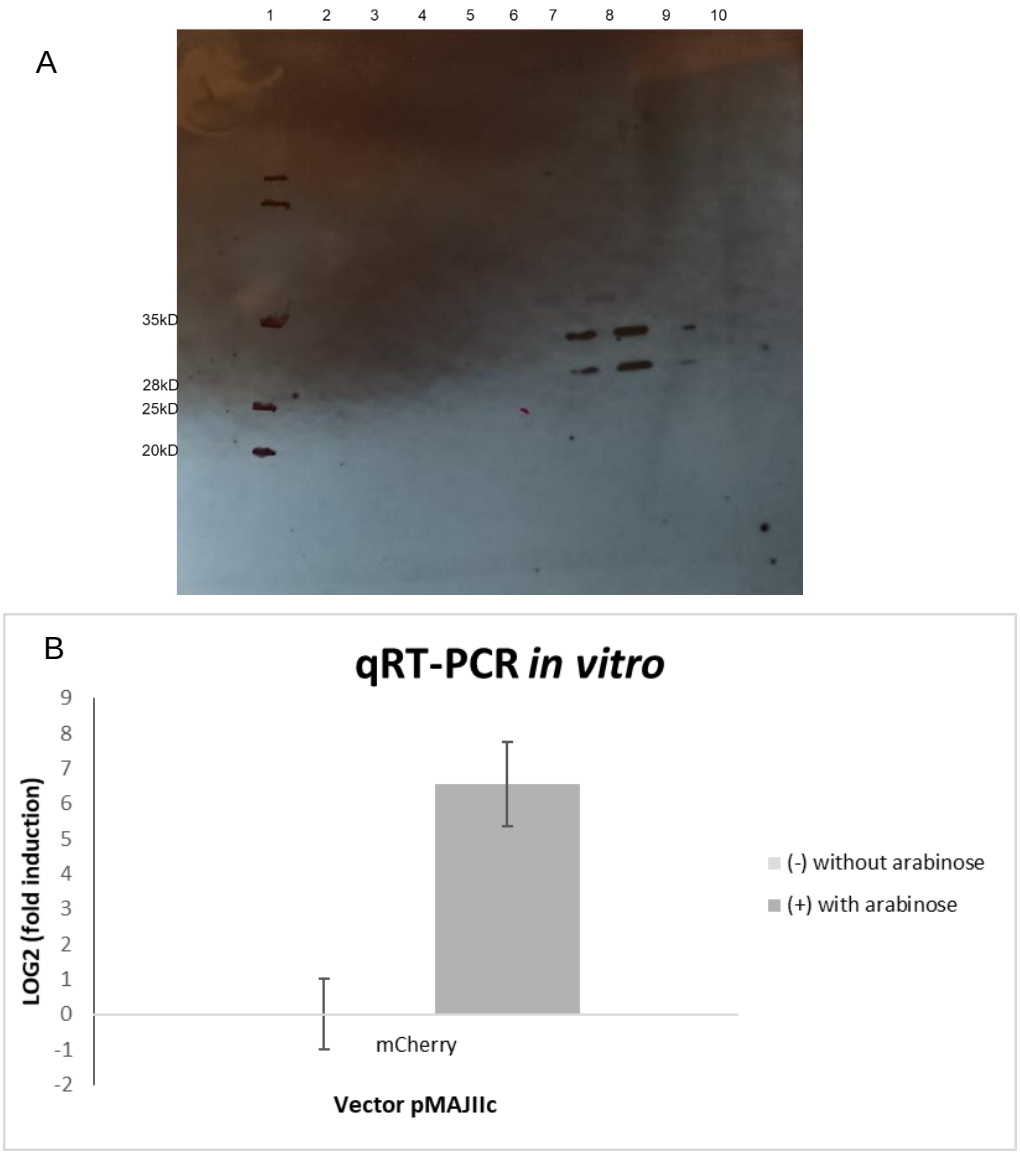


Figure 5: Effect of arabinose on the expression of mCherry. A: immunoblotting detection of mCherry protein expressed from pMAJIIc vector. Lane 1: molecular weight; lanes 2 and 3: *X. citri* wild-type with and without arabinose supplementation, respectively; lanes 4, 5 and 6: *X. citri* pMAJIIc without arabinose supplementation; lanes 7, 8 and 9: *X. citri* pMAJIIc supplemented with 0,05% arabinose, lane 10: empty. B: mCherry expression level measured by qRT-PCR. No expression was observed from the untreated sample.

Discussion

Here we demonstrated the application of an integrative vector (pMAJIIc) for expression and subcellular localization of proteins-mCherry fusions in *Xanthomonas* sp. Fluorescent proteins has been used in this bacterium for different purposes (CUBERO et al., 2011; PETROCELLI et al., 2012; SILVA et al., 2013; UCCI et al., 2014), but this is the first report about proteins localization in *Xanthomonas* using mCherry as fluorescent marker. The protein localization system developed in this work has pGCD21 vector (LORENZONI et al., 2017) as backbone for the construction of pMAJIIc vector.

X. citri transformed with pMAJIIc vector were pathogenic as the wild-type strain and were proved to maintain the mCherry plasmid integrated through several generations. Integration into *X. citri* chromosome is mediate by a single homologous crossover event that could occur by either the ORF to be characterized/localized or the *α-amylase* fragment locus. For the empty vector and all the cloned genes constructions, the integration into *amy* locus were selected to avoid the possibility of gene/protein inequality and to guarantee the controlled fully expression of the target gene with the fusion protein. In addition, the *amy* locus disruption provides a readily distinguishable transformed colony screening selection method (LEWIS; MARSTON, 1999; FEUCHT; LEWIS, 2001; MARTINS et al., 2010).

The mCherry gene has pBAD as a promoter and its operon can be controlled by the concentration of arabinose in the medium, allowing the regulation of the expression of the fusion protein. Although in absence of arabinose transcription occurs at very low levels (LEE, 1980; LACERDA et al., 2017), *X. citri* strains does not showed any leakage and the mCherry expression was only detected when arabinose was added to the medium in a minimum concentration of 0.05%. The arabinose system is well characterized in *E. coli* and the AraC protein is both a positive and negative regulator (CARRA; SCHLEIF, 1993); however, the efficient expression/repression depends on several factors. The ability to degrade arabinose, the physiological state of the culture associated with the type of medium and carbon sources (GUZMAN et al., 1995) are essential to determine the efficiency of the bacterial strains. Guzman and coworkers (1995) evaluated different strains of *E. coli* and different growing media and

similar results were achieved. According to their results, the functionality of pBAD can be improved by using alternative compounds.

Fluorescent proteins have been widely applied in protein localization and gene expression in rod-shaped bacteria studies and it has brought new insights into the cell biology of these microorganisms (BEILHARZ et al., 2015). Some of these fluorescent proteins contains at least one cysteine residue, and to produce the fluorescence it must be correctly folded, otherwise there is no autocatalytic chromophore formation reaction (CONSTANTINI et al., 2016). Subcellular spaces, like periplasm of Gram-negative bacteria, are oxidizing environments that promote disulfide bond formation and it is highly unlikely that fluorescent proteins could achieve the necessary chromophore formation structure if cysteine residue incorporate into that bonds (CONSTANTINI et al., 2016; DAMMEYER; TINNEFELD, 2012). To avoid this problem, a new monomeric proteins family – mFruit – were created. These proteins are more tolerant to N-terminal fusions, photostability, maturation and had its cysteine binding mutated for histidine, therefore the possibility of oxidation was eliminated (SHANER et al., 2004).

Fluorescence microscopy has played an important role in determining the activity of cells, its structure and biological phenomena (SANDERSON et al., 2014). We were able to detect expression of functional mCherry fusion proteins in cells grown in liquid culture. Two different proteins from *X. citri* we select based on its predicted cellular localization based in other microorganisms' homologues and microscopy analysis was able to reveal its localization in *X. citri*.

The cytoplasmic protein GyrB is a type II topoisomerase which can supercoil and uncoil DNA helix during DNA replication, transcription and recombination (CHAMPOUX, 2011). In *X. citri* cell, GyrB was visualized spread all over the cell with discrete points of accumulation close to cellular pole. As showed by Ucci and coworkers (2014), chromosome replication in *X. citri* starts in one of the cell poles and it is asymmetric, meaning that the protein was localized in the correct position probably attached to the bacterium chromosome. Tadesse and Graumann (2006) described the subcellular localization of *Bacillus subtilis* gyrase as not static but very dynamic. Gyrase was present on the nucleiods, showing accumulation in *B. subtilis* growing cells, although the accumulation assembled and disassembled in few minutes (TADESSE; GRAUMANN, 2006).

Fluorescence images from the construction pMAJIIc -*vrp*A in *X. citri* showed a strong emission surrounding the outer membrane of the bacteria cells, as expected for periplasmic proteins (SKOOG et al., 2012; KE et al., 2016). VrpA is a periplasmic protein of *X. citri* and it interacts with periplasmic type-III secretion (T3S) system components HrcJ and HrcCo (ZHOU et al., 2015). The T3S system is part of injectisome of Gram-negative bacteria, a hypodermic needle-like organelle responsible to delivers pathogenic effector porteins into host cells (KUBORI et al., 1998). Wee and Hughes (2015) showed the injectisome structure of Samonella, and according to the electron micrographs of the stained cells, this organelle is embedded in the cell wall spanning the periplasmic space between the inner and outer membranes.

From these results, we were able to show the pattern and subcellular localization for cytoplasmatic and periplasmatic proteins of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* using pMAJIIc vector. The vector will facilitate further analysis of protein functions and improve the application of fluorescent proteins in bacteria.

Acknowledgments

This work is part of the Ph.D. thesis of M. M. Pena and was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001. We thank Dr. Henrique Ferreira for providing the plasmids pGCD21, pSG1194, and for the kindly assistance and support with the microscope, microplate device and helpful comments. Citrus Research and Education Center for allowed to use their microscope facilities. We also thank Dr. Fernanda Nogales, Dr. Yosvani Acanda and Naiara Zancanari for the support with experimental assays and analyzes.

References

ABE, V. Y.; BENEDETTI, C. E. Additive roles of PthAs in bacterial growth and pathogenicity associated with nucleotide polymorphisms in effector-binding elements of citrus canker susceptibility genes. **Molecular Plant Pathology,** v. 17, p.1223-1236, 2015.

BEHLAU, F.; CANTEROS, B. I.; JONES, J. B.; GRAHAM, J.H. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Eur. J. Plant Pathol**, v. 133, p. 949-963, 2012.

BEHLAU, F.; FONSECA, A.; BELASQUE, J. A comprehensive analysis of the Asiatic citrus canker eradication programme in Sao Paulo State, Brazil, from 1999 to 2009. **Plant Pathol**, v. 65, p. 1390-1399, 2016.

BEILHARZ, K.; RAAPHORST, R.V.; KJOS, M.; VEENING, J.W. Red fluorescent proteins for gene expression and proteins localization studies in *Streptococcus pneumoniae* and efficient transformation with DNA assembled via the Gibson assembly method. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 7244-7252, 2015.

BRADBURY, J. F. Genus II Xanthomonas. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). Bergey's manual of systematic bacteriology. London: Williams & Wilkins, v. 1, p. 199-210, 1984.

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

CARRA, J. H.; SCHLEIF, R.F. Variation of half-site organization and DNA looping by AraC protein. **EMBO J,** v. 12, p. 35-44, 1993.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802- 805, 1994.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 369-413, 2001.

COSTANTINI, L. M.; BALOBAN, M.; MARKWARDT, M. L.; RIZZO, M.; GUO, F.; VERKHUSHA, V. V.; SNAPP, E. L. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. **Nat Commun**, v. 6, p. 7670, 2016.

CUBERO, J.; GELL, I.; JOHNSON, E. G.; REDONDO, A.; GRAHAM, J. H. Unstable green fluorescente protein for study of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* survival on citrus. **Plant Pathology**, v. 60, p. 977- 985, 2011.

DAMMEYER, T.; TINNEFELD, P. Engineered fluorescent proteins illuminate the bacterial periplasm. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.3, p. e201210013, 2012.

DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; SLUYS, M. A. V.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-

DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; TRINDADE DOS SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

DINH, T.; BERNHARDT, T. G. Using superfolder green fluorescent protein for periplasmic protein localization studies. **Journal of Bacteriology,** v. 193, p. 4984-4987, 2011.

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

DUELLMAN, T.; BURNETT, J.; YANG, J. Quantification of secreted proteins using mCherry fusion constructs and a fluorescent microplate reader. **Anal Biochem,** v. 473, p. 34–40, 2015.

FEUCHT, A.; LEWIS, P. J. Improved plasmid vectors for the production of multiple fluorescent proteins fusions in *Bacillus subtilis*. **Gene**, v. 264, p. 289-297, 2001.

GOODIN, M. M.; DIETZGEN, R. G.; SCHICHNES, D.; RZIN, S.; JACKSON, A. O. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. **The Plant Journal,** v. 31, p. 375-383, 2002.

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

GUZMAN, L.M.; BERLIN, D.; CARSON, M. J.; BECKWITH, J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. **J Bacteriol**, v. 177, p. 4121-4130, 1995.

KE, N.; LANDGRAF, D.; PAULSSON, J.; BERKMEN, M. Visualization of periplasmic and cytoplasmic proteins with a self-labeling protein tag. **Journal of Bacteriology**, v. 198, p. 1035- 1043, 2016.

KUBORI, T.; MATSUSHIMA, Y.; NAKAMURA, D.; URALIL, J.; LARA-TEJERO, M.; SUKHAN, A.; GALAN, J. E.; AIZAWA, S-I. Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system. Science, v. 280, p. 602-305, 1998.

LACERDA, L. A.; CAVALCA, L. B.; MARTINS, P. M. M.; GOVONE, J. S.; BACCI, JR.M.; FERREIRA, H. Protein depletion using the arabinose promoter in Xanthomonas citri subsp. citri. **Plasmid**, v. 90, p. 44-52, 2017.

LEE N. Molecular aspects of ara regulation, In J. H. Miller and W. S. Reznikoff (ed.), The operon. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**, N.Y. p. 389–410, 1980.

LEWIS, P. J.; MARSTON, A. L. GFP vectors for controlled expression and dual labeling of protein fusions in *Bacillus subitilis.* **Gene**, v.227, p. 101-110, 1999.

LI, J.; WANG, N. Foliar application of biofilm formation-inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. citri. **Bacteriology**, v. 104, p. 134-142, 2013.

LORENZONI, A. S. G.; DANTAS, G. C.; BERGSMA, T.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D-J. *Xanthomonas citri* MinC oscillates from pole to pole to ensure proper cell division and shape. **Front. Microbiol**, v. 8, p. 1352, 2017.

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, JR. M.; BELASQUE, J.; DO AMARAL, A. M.; TABOGA, S. R.; FERREIRA, H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 310, p. 76-83, 2010.

ORCE, I. G.; DEBES, M.; SENDIN, L.; LUQUE, A.; ARIAS, M.; VOJNOV, A.; MARANO, M.; CASTAGNARO, A.; FOLOPPONE, M. P. Closely-related *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolates trigger distinct histological and transcriptional responses in Citrus limon. **Scientia Agricola,** v. 73, p. 552-558, 2016.

PETROCELLI, S.; TONDO, M. L.; DAURELIO, L. D.; ORELLANO, E. G. Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Lipopolysaccharide Affect the Basal Response and the Virulence Process during Citrus Canker. **PLoSONE**, v. 7, p. e40051, 2012.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 203-207.25, 2001.

RAMSOM, E. M.; ELLERMEIER, C. D.; WEISS, D. S. Use of mCherry red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 81, p. 1652-1660, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A LaboratoryManual. Cold SpringHarbor: **Cold SpringHarbor Laboratory Press**, 1989.

SANDERSON, M. J.; SMITH, I.; PARKER, I.; BOOTMAN, M. D. Fluorescence microscopy. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 12, p. 1042-1065, 2014.

SHANER, N. C.; CAMPBELL, R. E.; STEINBACH, P. A.; GIEPMANS, B. N. G.; PALMER, A. E.; TSIEN, R. Y. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent

proteins derived from *Discocoma* sp. red fluorescent protein. **Nature Biotechnology,** v. 22, p. 1567 – 1572, 2004.

SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRONIO, M. S.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; BELASQUE, JR. J.; SACRAMENTO, L. V. S.; FERREIRA, H. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of Bacteriology**, v. 195, p. 85-94, 2013.

SKOOG, K.; SODERSTROM, B.; WLDENGREN, J.; HELJNE, G. V.; DALEY, D. O. Sequential closure of the cytoplasm and then the periplasm during cell division in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 584- 586, 2012.

TADESSE, S.; GRAUMANN, P. L. Differential and dynamic localization of topoisomerases in *Bacillus subtilis.* Journal of Bacteriology, v. 188, p. 3002-3011, 2006.

UCCI, A. P.; MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, JR. M.; BELASQUE, JR. M.; FERREIRA, H. Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. **Microbiology Open,** v. 3, p. 29-41, 2014.

WEE, D. H.; HUGHES, K. T. Molecular ruler determines needle length for the Salmonella Spi-1 injectisome. **PNAS**, v. 112, p. 4098-4103, 2015.

ZHANG, Q.; WALAWAGE, S. L.; TRICOLI, D. M.; DANDEKAR, A. M.; LESLIE, C. A. A red fluorescent protein (DsRed) from *Discosoma* sp. as a reporter for gene expression in walnut somatic embryos. **Plant Cell Rep,** v. 34, p. 861-869, 2015.

ZHANG, S.; ZHAO, B.; LIU, X.; GAO, Z.; HUANG, X. Construction of a new GFP vector and its use for *Fusarium oxysporum* transformation. **Saudi Journal of Biological Sciences,** v. 20, p. 23-27, 2012.

ZHOU, X.; HU, X.; LI, J.; WANG N. A novel periplasmic protein, VrpA, contributes to efficient protein secretion by the type III secretion system in Xanthomonas spp. **MPMI**, v. 28, p. 143-153, 2015.

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

Supplementary material

Table S1: Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence
mCherryF	5’ - AACTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGG
mCherryR	5’- TTGCGGCCGCCTGCTTCCTTGTACAGCTCGTCCATGC
pMAJ1_PL_F	5’- CTAGCAGGAGGAAAGATCATATGGGTACCGTCGACC
pMAJ1_PL_R	5’- TCGAGGTCGACGGTACCCATATGATCTTTCCTCCTG
VrpA_IF_F	5` - AGATCCATGGCACTCGAGATGCGATATCTACTGC
VrpA_IF_R	5`- CTCACCATCTCGAGCAGGTCTTGCTCGTATCTGACGTAC
gyrB_IF_F	5` - AGATCCATGGCACTCGAGATGACCGACGAACA
gyrB_IF-R	5` - GCTCACCATCTCGAGGATATCCAGGTTGGACAC
mCherry_RT_F	5` - CTGAGGTCAAGACCACCTACAAG
mCherry_RT_R	5`- GTACTGTTCCACGATGGTGTAGTC
gyrA_RT_F	5` - GTCAAGGAAAAGAAGCTCGAAG
gyrA_RT_R	5` - GCTGATACAGGTTGTTGAGCAC

CAPÍTULO 3 – Subcellular localization of EnvC homologue and its role in cell separation and virulence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

M. M. Pena[1*], T. Z. Martins[1*], D. Teper[2], N. Wang[2], M. I. T. Ferro[3], H. Penha[3], C. Zamuner[4], J. A. Ferro[3#]

[1] Agricultural and Livestock Microbiology Graduation Program, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, Brazil

[2] Department of Microbiology and Cell Science, Citrus Research and Education Center, University of Florida, Lake Alfred, U.S.A

[3] Department of Technology, São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, Brazil

[4] Department of Biochemistry and Microbiology, São Paulo State University (UNESP), Biosciences Institute, Rio Claro, Brazil

[#] jesusapferro@gmail.com

* These authors contributed equally to this study

Abstract

Peptidoglycan hydrolases are enzymes that hydrolase the peptidoglycan of the bacterial cell wall. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), the causal agent of citrus canker has in its genome a hypothetical protein (XAC0024), homologous to the *Escherichia coli* EnvC protein which possess a M23 peptidase domain. EnvC is a LytM factor absolutely required for septal peptidoglycan splitting and daughter cell separation. We investigated how EnvC contributed to virulence and cell separation in *X. citri*. We established that deletion of the *X. citri* gene encoding the EnvC homologue led to a reduction in virulence. When inoculated into Rangpur lime (*Citrus limonia*) leaves, *X. citri* mutant was delayed in causing citrus canker symptomatology compared with the wild-type strain. The morphological analyses of the cell cultures showed that the mutant lacking EnvC exhibited elongated cell shape and the subcellular localization confirmed that EnvC is a periplasmic protein.

Keywords: hydrolase, periplasmic protein, Xanthomonas cell division

Introduction

Xanthomonas citri subsp. *citri* (*X. citri*) is a phytopathogenic Gram-negative bacterium well known for causing citrus canker in most economically important citrus varieties worldwide (DAS, 2003). Due to its importance, *X. citri* has been the target of our research, focused on the characterization of hypothetical genes, some of them essential for *X. citri* biological processes.

As previously described by Laia and coworkers (2009), *X. citri* possess three hypothetical proteins which contain a peptidase M13 domain. One of these proteins, an EnvC homologue (XAC0024), is member of the LytM family and is widely distributed in bacteria (FIRCZUK; BOCHTLER, 2007). In *E. coli*, it was demonstrated that EnvC is responsible for the activation of AmiA and AmiB hydrolases during cellular division (MARCHLER-BAUER et al., 2015). Although other hydrolases like NlpD, YgeR, and YebA also play a role in cell separation, EnvC is the most critical LytM factor for the appropriate daughter cell developing (UEHARA et al., 2009). The predicted signal peptide in the N-terminal of *X. citri* EnvC protein suggest that this protein is exported to the periplasm space. Periplasmic components like VrpA have been shown to affect the type III secretion system, a critical apparatus for pathogenicity in many bacteria (ZHOU et al., 2015).

In the present study, we investigated whether the *X. citri* EnvC homologue, one of the LytM factors in *E. coli*, is involved in *X. citri* virulence by generating a mutant strain lacking for this gene. We found that EnvC homologue is essential for *X. citri* virulence, playing a role in the daughter cell separation process. Furthermore, studies of its subcellular localization using a red fluorescent protein (mCherry) as a marker revealed that *X. citri* EnvC is a periplasmic protein and the mutant strain display an altered morphological cell shape compared to the wild-type strain.

Material and methods

Bacterial strains, plasmids and culture condition

The bacterial strains and plasmids used are described in Table 1. *Escherichia coli* (*E. coli*) strains were grown in Luria-Bertani (LB or LB-agar, 15g/L) and SOB media (SAMBROOK et al., 1989) at 37°C. *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains were cultivated at 30ºC in NYG rich medium (3g/L yeast extract, 5g/L peptone, 20g/L glycerol, pH 7.0), NB medium (“Nutrient Broth”: meat extract 3g/L and peptone 5g/L) or on NB-agar (NA, 15g/L), supplemented with L-arabinose (0.05% w/v) and sucrose (5% w/v) when required. The antibiotics carbenicillin and kanamycin at the concentration of 50μg/mL, and ampicillin and spectinomycin at the concentration of 100μg/mL were used when required.

Table 1. List of strains and plasmids.

Strains	**Characteristics**	**References**
X. citri	Wild-type strain 306	DA SILVA et al., 2002
Δ*env*C	*envC* deletion mutant of *X. citri*	This work
Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C)	ΔenvC harboring pMAJIIc-*env*C; Ap^R; Neo^R/Km^R;	This work
E. coli DH10B	Cloning strain	Invitrogen
E. coli SM10λpir	Cloning strain	Laboratory Stock
E. coli Stellar	Cloning strain	Takara
Plasmids	**Characteristics**	**References**
pGEM® -T easy	lacZ; Ap^R;	Promega
pOK1	sacB-sacR; Sp^R	HUGUET et al., 1998
pMAJIIc	Derivative from pMAJIc; mCherry expression vector; Ap^R; Neo^R/Km^R; *ara*C-*ara*BAD*;* integrative vector in *X. citri*; polylinker;	PENA et al., 2019 (*In preparation*)

Ap^R: ampicilin resistance, Km^R: kanamycin resistance, Neo^R:neomycin resistance, Sp^R: spectinomycin resistance

Mutant construction and complementation

The mutant of the gene XAC0024 encoding the hypothetical protein with a M23 peptidase domain homologue to *E. coli* EnvC protein was obtained through site-directed mutagenesis by overlap extension approach using the polymerase chain reaction (HIGUCHI; KRUMMEL; SAIKI, 1988; MIKAELIAN; SERGEAN, 1996). To construct the deletion mutant, the XAC0024 gene was amplified from *X. citri* genomic DNA using the primers A(F), B(R), C(F), D(R) (all oligonucleotides are listed Table S1). The first PCRs amplifications were made separately, using two pairs of primers A(F)-B(R) and C(F)-D(R) to generate the templates with cohesive extremities. A second PCR was performed now using the primers A(F)-D(R), followed by an addition of a unique Adenine at the extremities of the amplicons. This amplicon was cloned into de

plasmid pGEM-T Easy; this step was necessary for the addition of the restriction sites for the enzymes *Apa*I and *Sal*I. The construction was used to transform *E. coli* DH10B cells and recover the plasmid for the next plasmid transformation. The next step of the mutant construction process was the digestion of both, amplicon and plasmid pOK1 using the restriction enzymes *Apa*I and *Sal*I. The construction was transformed into *E. coli* SM10λpir cells. All the constructions were checked by electrophoresis gel of PCR products and DNA sequencing. Finally, the construction was used to *X. citri* electrotransformation (DO AMARAL et al., 2005) and the mutant screening followed methodology described by Kaniga et al. (1991), using the NA medium and the spectinomycin antibiotic. The confirmed mutant was named Δ*env*C.

For complementation of the Δ*env*C mutant, a fragment containing the 1236-bp DNA coding region of *env*C gene and 500 bp upstream of the 5' end and 500 bp downstream of the 3' end was amplified using the primer set 0024_500_IF_F/ 0024_500_IF_R (Table S1) and Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs). The amplified 2236 bp DNA fragment was cloned into the plasmid pMAJIIc previously digested with *Xho*I using the *In-Fusion* as recommended by Takara Co. to generate the recombinant plasmid pMAJIIc-*env*C. The recombinant plasmid was first transformed into *E. coli* Stellar (Invitrogen). The transformed clone was first selected in LB-agar plates supplemented with carbenicillin followed by DNA sequencing. The construction was used to Δ*env*C electrotransformation (SAMBROOK et al., 1989; DO AMARAL et al., 2005), resulting in the complemented strain Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C). The complemented *X. citri* was checked by agarose gel of PCR product of genomic DNA using primers 0024_IF_F and 0024_IF_R and DNA sequencing.

Microscopy

The *X. citri* wild-type, Δ*env*C, Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) and *X. citri* pMAJIIc-*env*C were cultivated in NB medium at 30^{C} until OD_{600nm}~ 0.3. For chromosome visualization, DAPI stain were performed following the protocol described by MORÃO and coworkers (2018). For the subcellular localization of the EnvC protein, *X. citri* wild-type and *X. citri* pMAJIIc-*env*C were cultivated in NB medium supplemented with arabinose 0.05% until OD_{600nm}~ 0.3 at 30^{o}C and 200 rpm. Drops of 5µL of cell culture were placed on

microscope slides covered with a slide cover slip as described by MARTINS et al. 2010) and immediately visualized using an Olympus BX61 microscope equipped with a monochromatic camera OrcaFlash2.8 (Hamamatsu, Japan). Data collection and analyzes were performed with the software CellSens Version 11 (Olympus).

Pathogenicity assay and bacterial strains viability

The pathogenicity tests were performed in triplicate using Rangpur lime (*Citrus limonia*) as plant host. Bacterial cells of *X. citri* wild-type, Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) were diluted to 10^6 CFU mL^{-1} using NaCl 0,9% solution (for *X*. *citri*, an OD_{600nm} equal to 0.3 corresponds to 10^6 CFU mL^{-1}). The cultures were inoculated as well as a negative control (NaCl 0,9%) on the leaves abaxial surface using a hypodermic syringe. Symptoms were observed for two weeks and the photos were taken at the 3, 5, 7, 10, 12 and 15 DAI (days after inoculation).

Following the pathogenicity test, an *in planta* growth curve was performed for *X. citri* wild-type and Δ*env*C. Cultures were diluted to 10^6 CFU mL^{-1} using ultrapure water and inoculated in Rangpur lime by leaf infiltration in four different spots. Bacteria were recovered using $1cm^2$ leaf discs from the inoculation at 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 and 25 DAI and plated with serial dilution for colony count.

X. citri wild-type, Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) were cultivated in NB medium for 16 h at 30ºC and 200 rpm to perform the *in vitro* growth curve. Cultures were diluted in fresh NB medium to an O.D.600nm of ~ 0.1 and a final volume of 1.5 mL. Cell cultures were distributed in the wells of a 24-wells microtiter plate and incubated in a microtiter plate reader (Synergy H1M1; BioTek) at 30C with constant agitation (200 rpm) and O.D.600nm were measured every 30 min for 72 hours (LACERDA et al., 2017).

Protein Modeling

The XAC0024 protein sequence was retrieved from the *Xanthomonas* sp. database (http://iant.toulouse.inra.fr/) and used as query on the NCBI - BLASTP (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) to obtained the Protein Data Bank (PDB) identity of the

protein with high level of coverage, since XAC0024 does not have an ID number in PDB. The PDB ID is necessary for DALI program (HOLM; LAAKSO, 2016) in order to have the graphical visualization of protein 3-D structure.

Results

X. citri encodes an EnvC-like protein that is conserved in many bacteria

Previously we showed that *X. citri* encodes three hypothetical proteins sharing the M23 peptidase domain (LAIA et al., 2009). One of these hypothetical proteins (XAC0024) is highly conserved in other sequenced *Xanthomonas* species as showed by the Neighbor-Joining" tree (SAITOU; NEI, 1987) (Figure 1).

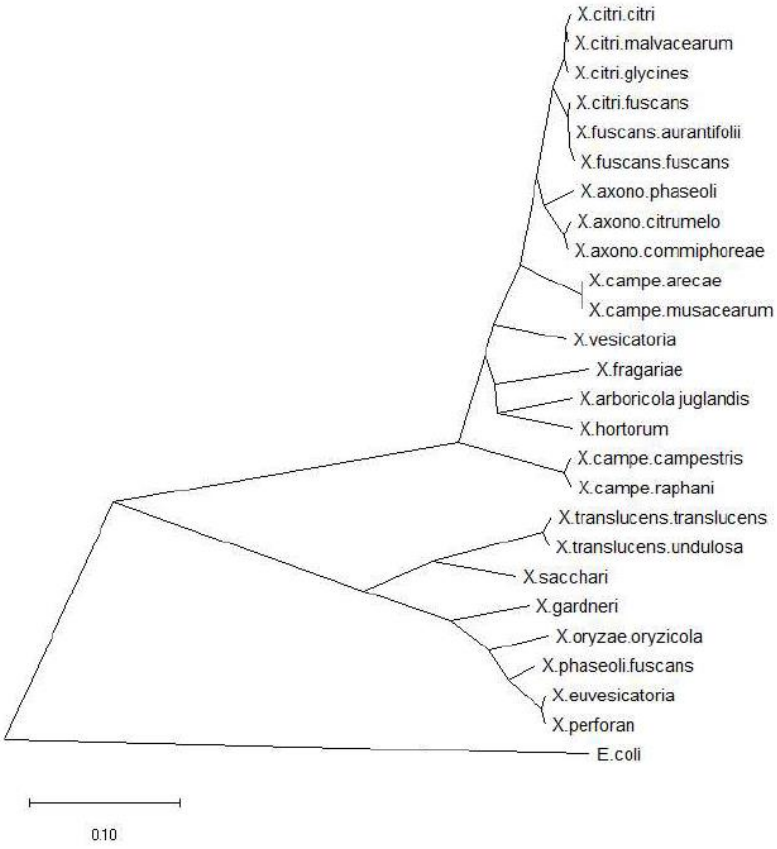


Figure 1: Neighbor-Joining tree for the *Xanthomonas* species using the nucleotide sequences recovered from NCBI data bank. The sequence alignment was made using ClustalW (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) available in the BioEdit 7.0.9.0

software (HALL, 1999). The Neighbor-Joining tree was generate using MEGA X software (KUMAR et al., 2018).

A nucleotide sequence comparison between XAC0024 from *Xanthomonas citri* and the recently published homologue XCC0022 from *Xanthomonas campestris* showed a coverage of 98% and 85% of identity between the two sequences. The protein sequence analyses showed that XAC0024 and XCC0022 shared an identity of 89%, a coverage of 98% and similarity of 93%. Compared with the protein EnvC from *Escherichia coli* (*E. coli*), XAC0024 protein sequence is 33% identical and share a similarity of 52% and coverage of 99% (Figure S1 A and B). As XAC0024 protein does not have the 3-D structure predicted at the Protein Data Bank (PDB), we used its protein sequence as a query for the graphical 3-D molecular model performed by I-TASSER server (Figure 2). Based on the similarity between the proteins from *E. coli* and *X. citri*, we named XAC0024 as EnvC.

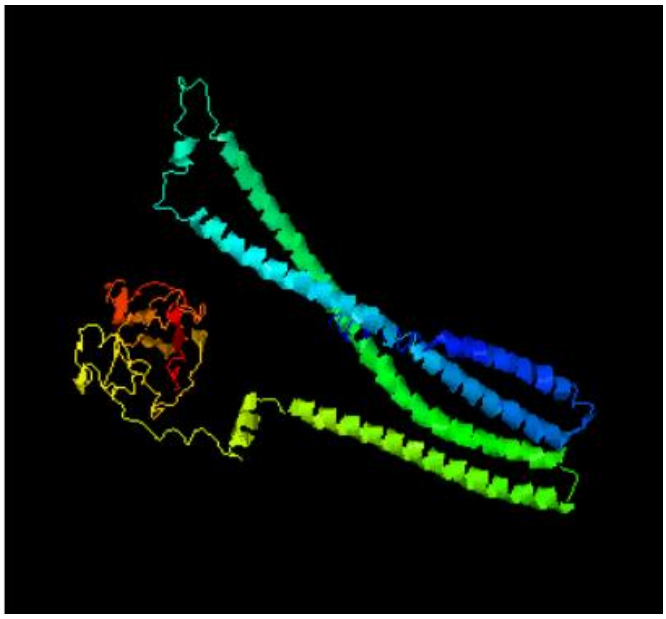


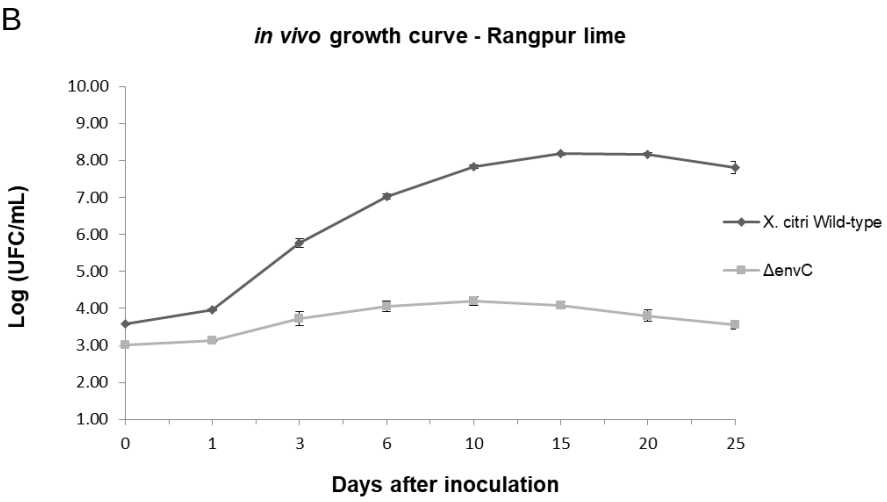
Figure 2: 3-D molecular model of EnvC protein (XAC0024) based on the predicted structure performed by I-TASSER server.

Deletion of *env*C affects *X. citri* virulence

The mutant Δ*env*C showed a delay in citrus canker symptoms and produced less severe lesions compared with the typical canker disease symptoms caused by *X. citri* wild-type (Figure 3A). The symptoms observed 15th day after inoculation showed the *X. citri* wild-type causing hyperplasia, hypertrophy, yellow borders and necrosis. The deletion mutant Δ*env*C showed only the initial stages of the disease in the point of inoculation (Figure 3A). The complemented strain Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) were able to restore the wild-type phenotype, showing typical canker diseases as described above for the *X. citri* wild-type (Figure 3A).

For the *in planta* growth curve, plant disks were collected from inoculated leaves for *X. citri* wild-type and Δ*env*C strains and plated in NA medium after serial dilutions. *X. citri* wild-type and Δ*env*C strains showed different development *in vivo* (Figure 3B). The mutant Δ*env*C capability of developing in the host environmental was reduced and at the 10th day after inoculation these bacteria showed patterns of declined phase, being considered incapable of multiplying in plant mesophyll.

In addition, *in vitro* growth curve was performed to evaluate the viability of Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) strains in comparison with the *X. citri* wild-type to develop and doubling along the time (Figure 3C). The in vitro growth curve showed that both Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) and *X. citri* wild-type strains grew equally over time without significant difference. However, Δ*env*C mutant displayed a different growth pattern and didn't reach the same growth level of the Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) and *X. citri* wild-type. Taken together, these results confirm that complementation notably restored the virulence to the Δ*env*C strain and suggest that EnvC is required for the virulence of *X. citri*.



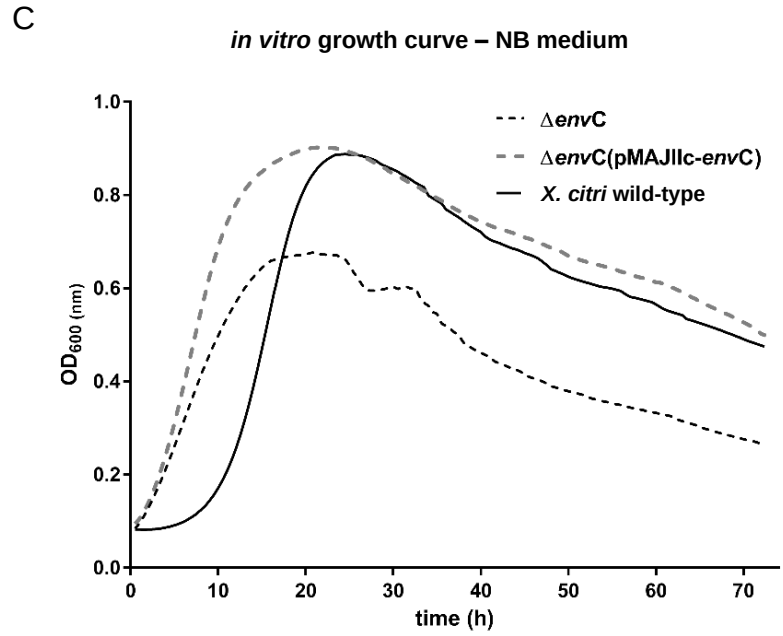


Figure 3: Pathogenicity assay and growth curves for *X. citri* wild-type, Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C). Canker symptoms can be visualized during the 15 days of plant inoculation. EnvC is required for pathogenicity of *Xanthomonas citri* subsp *citri*. A: Rangpur lime leaves inoculated with *X. citri* wild-type, Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) strains on the abaxial leaves surface. B: *in vivo* growth curve. Leaves disks were collected from Rangpur lime at 0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 and days after inoculation with *X. citri* wild-type and Δ*env*C strains and the bacteria development were evaluated after grown in NA medium plates. C: *in vitro* growth curve. *X. citri* wild-type, Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) were cultivated in NB medium and the OD_{600nm} were measured for 72 hours. Tests were carried out in triplicate.

Periplasmic protein EnvC is required for *X. citri* daughter cell separation

The subcellular localization of EnvC was accessed by the mCherry fluorescence emission pattern for the construction *X. citri* pMAJIIc-*env*C (Figure 4). Bacteria cells showed a strong fluorescence signal spread around the cell edges, while the cytoplasm remained non-fluorescent, characteristic of periplasmic proteins (Figure 4B-C). We use the *X. citri* wild-type as a negative control and comparing with *X. citri* pMAJIIc-*env*C strain no fluorescence emission could be observed (Figure 4E-F).

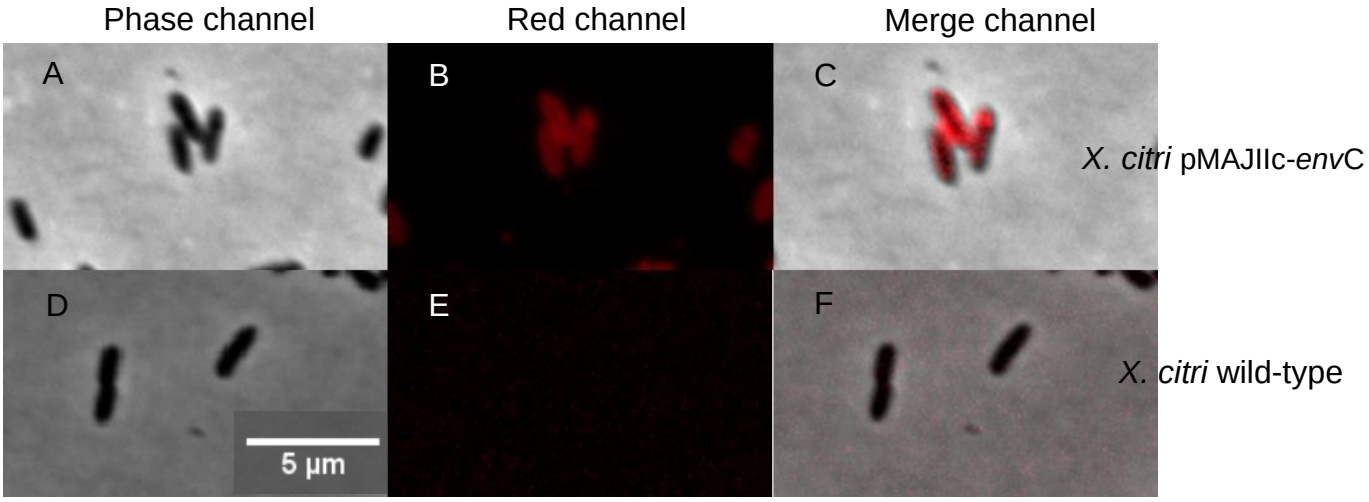


Figure 4: Subcellular localization of EnvC fusion with mCherry in *X. citri* pMAJIIc-*env*C strain. *X. citri* wild-type was used as negative control. The figure shows the phase contrast, TxRed and overlay of the two filters, respectively for: A – C: *X. citri* pMAJIIc-*env*C; D -F: *X. citri* wild-type. (magnification of 100X).

To obtain an insight about the role of EnvC in the cell division process and chromosome segregation, we examined *X. citri* wild-type, Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) cell shape and size (Figure 5). Cultures of mutant Δ*env*C showed cells with different shapes, including elongated rods, minicells and most of them with filaments shape (Figure 5 D-I). Percentages of the entire cell shapes observed in the cultures are show in Table 2. Cell filament chains were approximately 55.5% and minicell were 5.25% of the cell shapes in a culture (*n*= 400). A close inspection of these filamented cells showed the formation of septal constriction, although the position of the Z-ring was mis-placed, not precisely positioned in the middle of the rods (black arrows in

Figure 5 D and G). This characteristic possibly contributed to the formation of minicells and more elongated cells and lead us to suggest that Δ*env*C is impaired in cell division.

The mutant Δ*env*C nonfilamented cells looked apparently longer when compared with the *X. citri* wild-type strain (Table 2). In order to quantitatively evaluate this, we measured 400 individuals' cell of each culture (*X. citri* wild-type, Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C)) and the average cell length was calculated. We observed significant differences between the Δ*env*C compared with the other two strains *X. citri* wild-type and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C). The average of *X. citri* wild-type cell length was 1.18 ± 0.22 µm, Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) cell length average was 1.22 ± 0.29 µm and Δ*env*C mutants measured 1.89 ± 0.38 µm.

Table 2: Morphological analysis of *X. citri* construction according to cell length

	Cell length µm	Filaments %	Minicells %	Nucleoid %
X. citri wild-type	1.18 ± 0.22[a]	0	0	45.75
Δ*env*C	1.89 ± 0.38[b]	55.5	5.25	50.75
Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C)	1.22 ± 0.29[a]	0	0	66.75

Total *n*= 400 cells measured. Data correspond to the average cell length ± standard deviation. Same letters meaning no significant difference according to *Tukey test* - 0.05.

The chromosome organization was accessed using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dying (Figure 5). Cultures of Δ*env*C mutant showed a continuous distribution of chromosomal mass spanning through the elongated cells (Figure 5 E, F, H and I). The continuous distribution in some cells possibly prevented septal closure. For *X. citri* wild-type and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) a similar pattern of chromosome organization could be observed, and the strains did not show any chromosomal mass spanning through the cell (Figure 5 B, C, K and L). For all the strains, a strong signal of nucleoid accumulation in the middle or pole of the cells could also be observed (white arrows in Figure 5 B, H and K), following the described for *E. coli* wild-type strain (FREIESLEBEN et al., 2000).

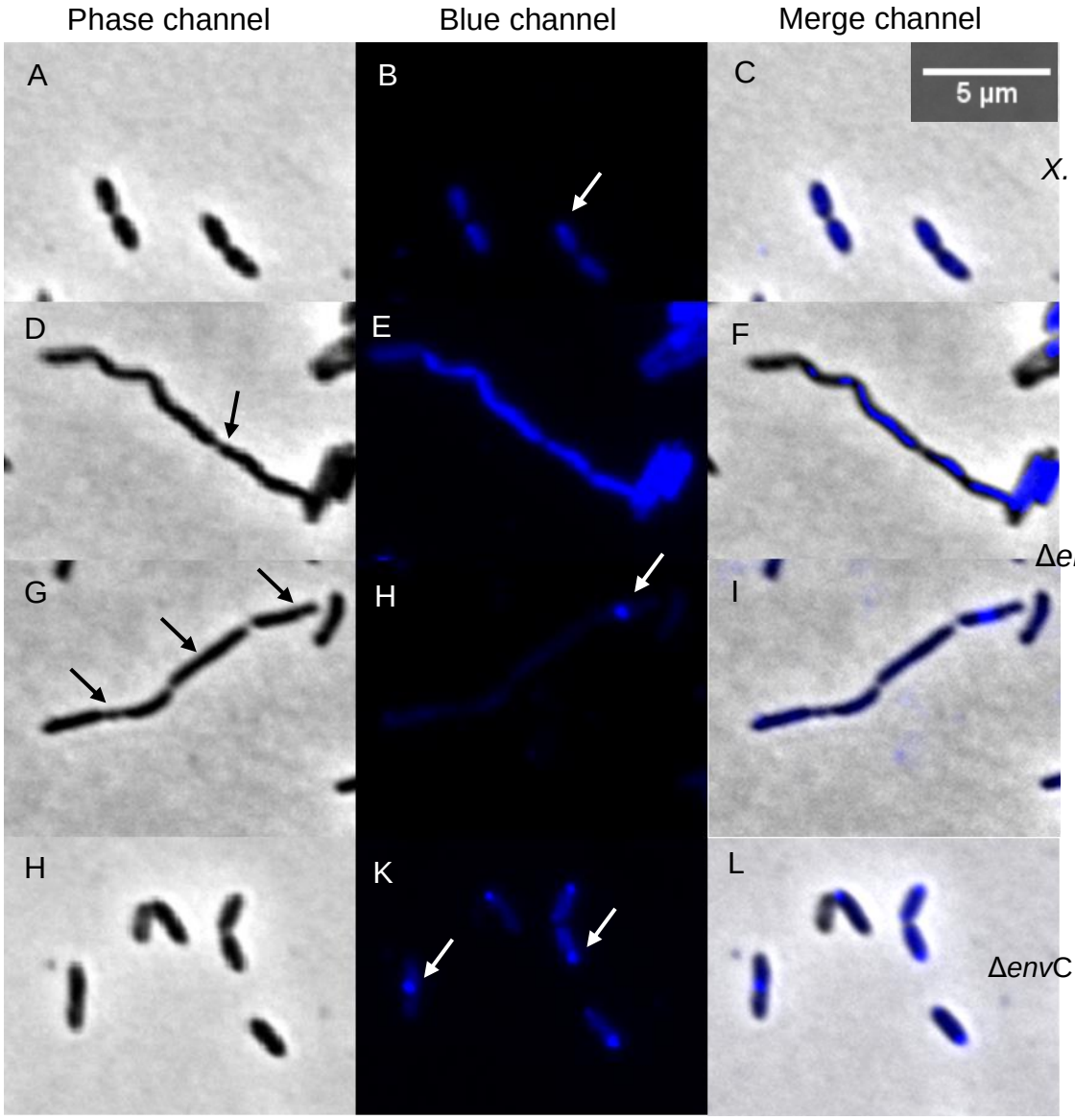


Figure 5: Morphological analysis and chromosomal segregation of *X. citri* wild-type, Δ*env*C and Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) strains. The figure shows the phase contrast, DAPI and overlay of the two filters, respectively for: A – C: *X. citri* wild-type); D – I: Δ*env*C and H – L: Δ*env*C (pMAJIIc-*env*C) (magnification of 100X). Black arrows indicate the Z-ring positions and white arrows indicates the nucleoid accumulation.

Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Acknowledgments

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

References

ARMENTEROS, J. J. A.; TSIRIGOS, K. D.; SONDERBY, C. K.; PETERSON, T. N.; WINTHER, O.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. V.; NIELSEN, H. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 420-423, 2019.

BERNHARDT, T. G.; de BOER, P. A. The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. **Mol. Microbiol**., v. 48, p.1171–1182, 2003.

BERNHARDT, T. G.; de BOER, P. A. Screening for synthetic lethal mutants in *Escherichia coli* and identification of EnvC (YibP) as a periplasmic septal ring factor with murein hydrolase activity. **Mol. Microbiol**., v. 52, p.1255–1269, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LACERDA, L. A.; CAVALCA, L. B.; MARTINS, P. M. M.; GOVONE, J. S.; BACCI, JR.M.; FERREIRA, H. Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid**, v. 90, p. 44-52, 2017.

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

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

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, JR. M.; BELASQUE, J.; DO AMARAL, A. M.; TABOGA, S. R.; FERREIRA, H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiol. Lett**, v. 310, p. 76-83, 2010.

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

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

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

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

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A LaboratoryManual. Cold SpringHarbor: **Cold SpringHarbor Laboratory Press**, 1989.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Supplementary material

Table S1: Oligonucleotides used in this study.

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

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

A

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

Range 1: 1 to 405 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
610 bits(1574)	0.0	Compositional matrix adjust.	359/405(89%)	378/405(93%)	0/405(0%)

```
Query  7    VLACTLLGSMGASAQSQRETERKLQQLRDELKTISADRRELEGKRGTAAQQLRQADEKVA  66
            + ACTLL    A AQSQRE ERKLQQLRDELKTISADRR+LEGKRGTAAQQLRQADEKVA
Sbjct  1    MFACTLLAGTSAGAQSQREAERKLQQLRDELKTISADRRDLEGKRGTAAQQLRQADEKVA  60

Query  67   KTARALSETEAAMRAQEQHLSTLQQERAQLQRGLQNQRAQLAALLRAADQVGRNAPLKVL  126
            KTARALSETE A+R  EQ LS LQQ+RAQLQRGL+ QR QLAALLRAAD VGRNAPLKVL
Sbjct  61   KTARALSETETALRTHEQKLSELQQQRAQLQRGLREQRVQLAALLRAADHVGRNAPLKVL  120

Query  127  LSQDTVGDATRMLADHRYVQNARAQRIHALTTQLDALATVEQDIATRRQALDAARAQQKA  186
            LSQDTVG+ATRMLADHRYVQ+ARAQRI  LTTQL+AL  VEQ I  RRQALDAARAQQKA
Sbjct  121  LSQDTVGNATRMLADHRYVQSARAQRIQGLTTQLEALTQVEQQITERRQALDAARAQQKA  180

Query  187  QAATLQKDRSQQAATVAQLDDRYKQRAEREKAIGQDAKALEQLLANLRAAAAKAEAERRA  246
            QA++L KDRSQQAATVAQLD RY+QRAEREKA+GQDAKALEQLLANLRAAAAKAEAERRA
Sbjct  181  QASSLLKDRSQQAATVAQLDTRYQQRAEREKALGQDAKALEQLLANLRAAAAKAEAERRA  240

Query  247  AARRAAAEAAAQAKRSKTERSDRPGKTPSKVVANAPAPKVGGLSWPVAGNLLARFNATLP  306
            AA+RAAAEAAAQAKR KT+R +RPGKTP KVVANAPAPKVGGLSWPV+GNLLARFNATLP
Sbjct  241  AAKRAAAEAAAQAKRGKTDRPERPGKTPPKVVANAPAPKVGGLSWPVSGNLLARFNATLP  300

Query  307  DGHTSKGVLIGAPKGTTVTAVADGTVVFSDWMTGYGMILIVDHGNGYMSLYAHNDTLLRD  366
            DGHTSKGVLIGAPKG+TVTAVADGTVVFSDWMTGYGMILIVDHGNGYMSLYAHNDTLLRD
Sbjct  301  DGHTSKGVLIGAPKGSTVTAVADGTVVFSDWMTGYGMILIVDHGNGYMSLYAHNDTLLRD  360

Query  367  AGATIKRGDAVAKVGSSGGQGVPALYFELRRNGQPVDPSSWLQRR  411
            AGA+IKRG+AVAKVGSSGGQGVPALYFELRRNGQPVDPSSWLQRR
Sbjct  361  AGASIKRGEAVAKVGSSGGQGVPALYFELRRNGQPVDPSSWLQRR  405
```

B

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

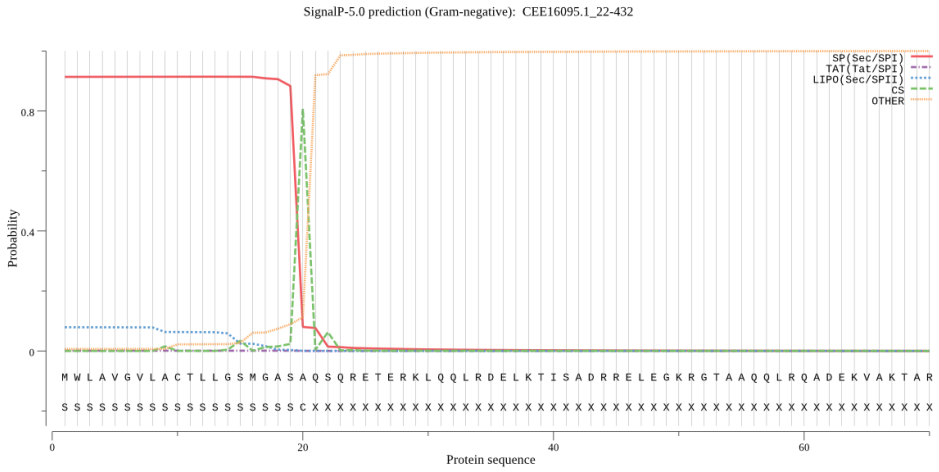
Range 1: 29 to 427 Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
196 bits(498)	9e-63	Compositional matrix adjust.	143/427(33%)	223/427(52%)	47/427(11%)

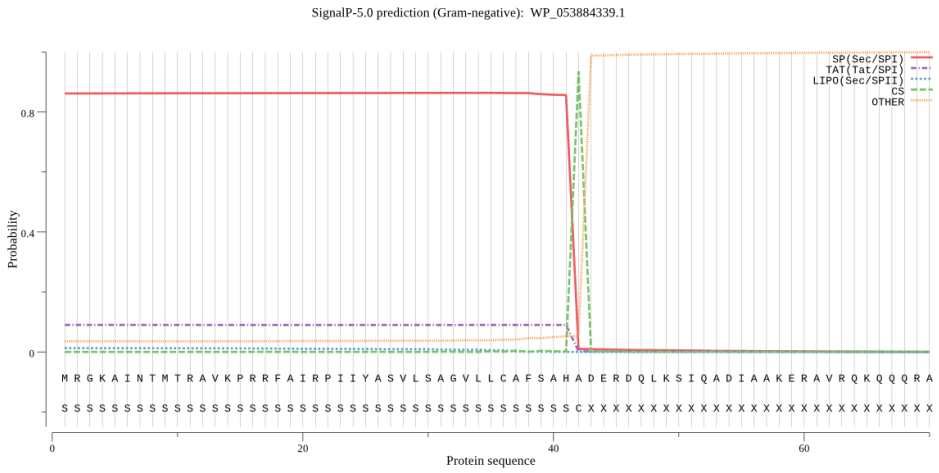
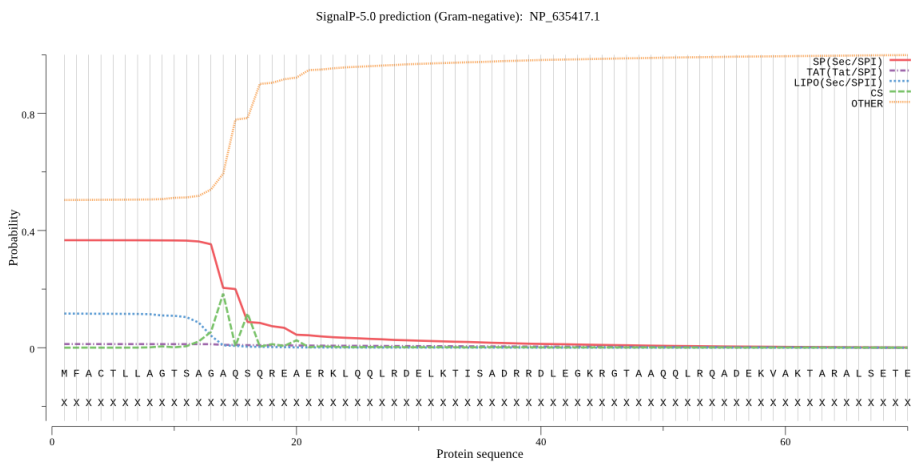
```
Query  3    LAVGVLACTLLGSMGASAQSQRETERKLQQLRDELKTISAD-------RRELEGKRGTAA  55
            L+ GVL C         SA +            RD+LK+I AD        R+ + +R +
Sbjct  29   LSAGVLLCAF------SAHADE---------RDQLKSIQADIAAKERAVRQKQQQRASLL  73

Query  56   QQLRQADEKVAKTARALSETEAAMRAQEQHLSTLQQERAQLQRGLQNQRAQLAALLRAAD  115
             QL++ +E +++  R L ET+  +    + +  +    A+L++    Q   LAA L AA
Sbjct  74   AQLKKQEEAISEATRKLRETQNTLNQLNKQIDEMNASIAKLEQQKAAQERSLAAQLDAAF  133

Query  116  QVGRNAPLKVLLSQDTVGDATRMLADHRYVQNARAQRIHALTTQLDALATVEQDIATRRQ  175
            + G +  ++++LS +      R+ A   Y+  AR + I  L           +++A +R
Sbjct  134  RQGEHTGIQLILSGEESQRGQRLQAYFGYLNQARQETIAQLKQ-------TREEVAMQRA  186

Query  176  ALDAARAQQKAQAATLQKDRSQQAATVAQLDDRYKQRAEREKAIGQDAKALEQLLAN---  232
             L+  +++Q+     L + R+QQA     L++R K  A  E +I Q  + L +L AN
Sbjct  187  ELEEKQSEQQT---LLYEQRAQQAKLTQALNERKKTLAGLESSIQQGQQQLSELRANESR  243

Query  233  LRAAAAKAEAERRAAARRAAAEAAAQAKRSKTERSDRPGKT--PSKVVANAPAPKVGGLS  290
            LR + A+AEA  +  A R A EA  QA R + + + R G T  P++    +   + GGL
Sbjct  244  LRNSIARAEAAAKVRAEREAREA--QAVRDRQKEATRKGTTYKPTES-EKSLMSRTGGLG  300

Query  291  -------WPVAGNLLARFNATLPDGHTSKGVLIGAPKGTTVTAVADGTVVFSDWMTGYGM  343
                   WPV G  L R+   L      KG++IGA +GT V A+ADG V+ +DW+ GYG+
Sbjct  301  APRGQAFWPVRGPTLHRYGEQLQGELRWKGMVIGASEGTEVKAIADGRVILADWLQGYGL  360

Query  344  ILIVDHGNGYMSLYAHNDTLLRDAGATIKRGDAVAKVGSSGGQGVPALYFELRRNGQPVD  403
            +++V+HG G MSLY +N + L   G+ ++ G  +A VGSSGGQG P+LYFE+RR GQ V+
Sbjct  361  VVVVEHGKGDMSLYGYNQSALVSVGSQVRAGQPIALVGSSGGQGRPSLYFEIRRQGQAVN  420

Query  404  PSSWLQR  410
            P  WL R
Sbjct  421  PQPWLGR  427
```

Figure S2: Predicted signal peptide for: A: *XAC0024* from *Xanthomonas citri*; B: EnvC from *Escherichia coli*; C: XCC0022 from *Xanthomonas campestris.* The analysis was performed using the SignalP 5.0 Server (ARMENTEROS et al., 2019).

A



B



C