

MICHELE FERNANDA SOUZA DUTRA

**ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES DE *CANDIDATUS LIBERIBACTER ASIATICUS*,
BACTÉRIA ASSOCIADA AO HUANGLONGBING DOS CITROS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual Paulista
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Dr. Nelson Arno Wulff

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

D978a Dutra, Michele Fernanda Souza
Análise funcional de genes de *Candidatus* Liberibacter
asiaticus, bactéria associada ao huanglongbing dos citros /
Michele Fernanda Souza Dutra. – Araraquara : [s.n.], 2018
122 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Nelson Arno Wulff

1. Bactérias fitopatogênicas. 2. Lisozimas.
3. Bacteriófago. 4. Colicinas. 5. Bacteriocinas. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

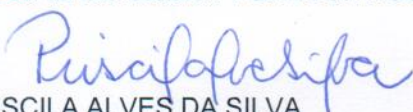
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Análise funcional de genes de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bactéria associada ao Huanglongbing dos citros"

AUTORA: MICHELE FERNANDA SOUZA DUTRA

ORIENTADOR: NELSON ARNO WULFF

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:


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


Profª. Drª. PRISCILA ALVES DA SILVA
Departamento Científico / FUNDECITRUS - Araraquara


Profª. Drª. ANDREA SOARES DA COSTA FUENTES
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR - São Carlos

Araraquara, 30 de agosto de 2018

DADOS CURRICULARES

Nome: Michele Fernanda Souza Dutra

Nome em citação Bibliográfica: Dutra, M. F. S.

Filiação: Adriano Dutra e Diana Márcia de Souza

Data de nascimento: 25/07/1994

Estado civil: Solteira

Telefone: (14) 99737-7158

E-mail: michele.084@terra.com.br

Resumo das Qualificações: Mestranda em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho- UNESP, na área de Biotecnologia Celular e Molecular. Tecnóloga em Processos Químicos e MBA em gestão da Qualidade e Produtividade Empresarial pelo Centro Universitário de Lins - (2015 e 2016)

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Biotecnologia

Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química - Araraquara.

Título: Análise funcional de genes de *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bactéria associada ao Huanglongbing dos citros

Orientador: Prof. Dr. Nelson Arno Wulff

Bolsista CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2015-2016

MBA em Gestão da Qualidade e Produtividade Empresarial

Centro Universitário de Lins (Unilins)

2012-2014

Graduação em Tecnologia em Processos Químicos

Centro Universitário de Lins (Unilins)

2010-2011

Curso Técnico em Química

Escola Técnica de Lins - Centro Paula Souza

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2015 – 2016

Auxiliar de Laboratório na Hemoprot - Indústria de Produtos Frigoríficos Ltda, Carga horária: 40, Regime: Integral

2014 – 2014

Analista de laboratório na Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP, Carga horária: 30, Regime: Parcial

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Trabalhos apresentados em eventos

Tecnologia em Massa Alimentícia: Utilização de hemocomponente bovino como complemento proteico – 5º Seminário Internacional Luso-Brasileiro: Ciências do Ambiente e Empresariais (Resumo – 2014);

Obtenção de Biodiesel a Partir de Microalgas– 5º Seminário Internacional Luso-Brasileiro: Ciências do Ambiente e Empresariais (Resumo – 2014);

Plasma Bovino: de resíduo poluidor a ingrediente funcional – V Encontro Científico e Simpósio de Educação Unisalesiano (Completo – 2015);

Tecnologia em Massa Alimentícia: Utilização de hemocomponente bovino como complemento proteico – 18º Simpósio de Iniciação Científica Unilins (Completo – 2015);

Heterologous expression of *Candidatus Liberibacter* spp. genes with potential role in bacterial competition - 2nd São Paulo XanthoMeeting (2018): plant Pathogens, antimicrobial agents, disease management and control (Resumo – 2018);

1. Outros

14º CONECTE – Congresso de Educação Ciência e Tecnologia “Ciência e Esportes” (2013)

Bolsa de Estudos de 100% para curso de Pós-Graduação Lato Sensu – Melhor aluno de Tecnologia em Processos Químicos – Unilins (Turma 2014);

VI Semana de Tecnologia e 16º CONECTE – Congresso de Educação Ciência e Tecnologia (2015)

IV SIMPÓSIO MASTERCITRUS – FUNDECITRUS – ARARAQUARA - Mestrado Profissional em controle de doenças e Pragas dos citros (2017)

Curso Aspectos Bioquímicos e Moleculares da Indução de Resistência em Plantas a Patógenos, CBAB (Centro Brasil-Argentina de Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 90 horas (2018)

*Às minhas tias-mãe Cassilda e Izabel, e ao meu pai Adriano
se não fosse por vocês,
eu não estaria aqui*

*Em especial à minha querida avó Luzia,
que é mais do que uma mãe,
é um porto seguro*

Dedico,

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre me guiar em meus passos.

Ao Dr. Nelson Arno Wulff, pela confiança a mim depositada e valorosa orientação.

À minha amada família, avó Dona Luzia, pai Adriano, tias Cassilda, Izabel e Zilda, Sabryna, Suely, irmã Rapha, tio Luiz, primos Gabi e Geovane, e a todos os outros que sempre me incentivaram.

Ao meu namorado Lucas Elói pelo amor, carinho e compreensão, e a sua maravilhosa família, Tetê, Tião, Rafa, Lê e Tobby, por me apoiarem e me acolherem.

À Msc. Elaine Martins, pelo grandioso auxílio técnico, sugestões, incentivo e amizade.

Aos queridos amigos que ganhei em Araraquara, Mônica Neli, Josi Darolt, Priscila Alves, Laudecir Jr., Amanda Oliveira, Verônica Kastalski, Rosangela Kishi, Everton Carvalho, Letícia Camargo, Lourdes Carmona, Joicy Santos, Márcia Almeida e Tatiane Malara pelos conselhos, incentivos e risadas.

Aos amigos do Fundecitrus, Fabricio Jaci, Camila Fassini, Sidnei Alkimim e Eder Souza, pelo auxílio.

Aos amigos Juan Cifuentes e Fabricio Lanza pelo grande auxílio nas análises estatísticas.

À querida Prof.^a Msc. Elisete Peixoto de Lima, por me inspirar.

À Prof.^a Dr^a Maria Célia Bertolini pela disponibilização da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) e vetor pET28a.

À toda equipe do Laboratório de Pesquisa & Diagnóstico do Fundecitrus, pelo apoio técnico.

Ao Fundecitrus pela estrutura, e por todo apoio na realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram com este trabalho.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less“

- Marie Curie

RESUMO

O Huanglongbing (HLB) é a doença mais devastadora dos citros. No Brasil, o HLB está associado a presença de *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) e *Ca. L. americanus* (Lam), ambas transmitidas pelo psílídeo *Diaphorina citri*. O sequenciamento e anotação dos profagos SC1 e SC2 no genoma de Las, identificou uma possível bacteriocina do tipo colicina Ia em SC1, e uma possível proteína de imunidade a colicina em SC2. Lam apresenta profagos similares no seu genoma, porém SP2 é degenerado, sem proteína de imunidade. Como houve uma inversão notável na ocorrência de Las em relação à Lam no Brasil, com o predomínio atual de Las, a presença de ambos os profagos pode conferir uma vantagem adaptativa a Las pela atividade da bacteriocina. Adicionalmente, Las tem lisozimas cromossômicas e de profago, que também podem estar envolvidas em competição bacteriana. A incapacidade de cultivo axênico de Las e Lam requer o uso de sistemas heterólogos para estudos funcionais. Genes com potencial envolvimento na biologia do profago e na competição bacteriana, como as colicinas e lisozimas foram avaliados. As lisozimas CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515, obtidas dos isolados de Las 3PA e Las 4PA, e as colicinas SC1_gp060 e lam_678 obtidas de isolados de Las 2PA, Las Poona e Lam São Paulo foram clonadas em vetor de expressão pET28a e superexpressas em *E. coli* BL21 (DE3). O crescimento destas bactérias, mensurado pelas médias dos valores de absorbância (OD₆₀₀), mostraram efeito tóxico das construções com lisozimas, sendo que clones de *E. coli* BL21 (DE3) expressando CLIBASIA_04790 (pMD15) e ED07_RS0204515 (pMD17) cresceram cerca de 60 e 70% menos, respectivamente, quando comparados aos controles. Ensaio de SDS-PAGE e Western Blot com anticorpo anti-His6X, evidenciaram a presença de ambas as proteínas na fração insolúvel, de 20 kDa (pMD15) e 12 kDa (pMD17), confirmando a expressão das lisozimas. Para as colicinas, somente o clone expressando SC1_gp060 proveniente do isolado Poona (pMD16) mostrou efeito em *E. coli* BL21 (DE3), com redução de 70% no crescimento quando comparado aos controles. Estes resultados auxiliam a desvendar a relação entre genes com potencial vantagem adaptativa e seu envolvimento na biologia das Liberibactérias e podem justificar seu uso biotecnológico em plantas geneticamente modificadas contra o HLB.

Palavras Chave: *Candidatus Liberibacter* spp. Profagos. Competição bacteriana. Colicinas. Lisozimas. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

Huanglongbing (HLB) is the most devastating disease of citrus. In Brazil, HLB is associated with the presence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) and *Ca. L. americanus* (Lam), both transmitted by psyllid *Diaphorina citri*. Sequencing and annotation of prophages SC1 and SC2 in the genome of Las, reveals the presence of a putative bacteriocin, colicin Ia in SC1, while in SC2 a possible colicin immunity-protein was found. Lam has similar prophages in the genome, though SP2 is degenerated, without immunity gene. As there was a striking inversion in the prevalence of Las in detriment of Lam, the presence of both prophages may confer an adaptative advantage to Las, due to the activity of the bacteriocin. Additionally, Las encodes both a chromosomal and phage lysozyme that may also be involved in bacterial competition. The inability of axenic cultivation of Las and Lam requires the use of heterologous systems for functional studies. Genes with potential involvement in prophage biology and bacterial competition, such as colicins and lysozymes, were evaluated. The lysozymes ORFs CLIBASIA_04790 and ED07_RS0204515, from Las isolates 3PA and Las 4PA, and the colicins SC1_gp060 and lam_678 obtained from isolates Las 2PA, Las Poona and Lam São Paulo were cloned into expression vector pET28a and superexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. The growth rate of these bacteria, measured by means of absorbance values (OD₆₀₀), showed toxic effect of transformants expressing lysozymes, whereas *E. coli* BL21 (DE3) clones expressing CLIBASIA_04790 (pMD15) and ED07_RS0204515 (pMD17) grew about 60 and 70% when compared to controls. SDS-PAGE and Western Blot assays were performed with anti-His6X antibody, showing the presence of both proteins in the insoluble fraction, with 20 kDa (pMD15) and 12 kDa (pMD17), confirming lysozyme expression. In the case of the colicin, only the clone expressing SC1_gp060 from Las Poona strain (pMD16) showed toxic effect, showing reduction of 70% in growth rates when compared to the controls. These results help to unravel the relationship between genes with potential adaptive advantage and their involvement in the biology of Liberibacteria and may justify their biotechnological use in genetically modified plants against HLB.

Key-words: *Candidatus Liberibacter* spp. Prophage. Bacterial competition. Colicin. Lysozyme. Heterologous Expression

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Progresso temporal da incidência de plantas com sintomas de HLB no estado de São Paulo.....	19
Figura 2 - Sintomas de HLB.....	23
Figura 3 - Máxima Verossimilhança da árvore filogenética de <i>Candidatus</i> Liberibacter spp. com base na sequência do gene 16S rDNA.....	26
Figura 4 - Proporção de amostras enviadas por produtores, que foram positivas para Las, Lam e para o Fitoplasma do grupo IX.....	34
Figura 5 - Via de translocação das colicinas.....	36
Figura 6 - Mecanismo de ação da lisozima.....	38
Figura 7 - Esquema de indução bacteriana com três repetições biológicas.....	55
Figura 8 - Alinhamento dos primeiros 240 nucleotídeos para a ORF lisozima dos isolados de Las	63
Figura 9 - Amplificação da ORF SC1_gp060	65
Figura 10 - Amplificação da ORF lam_678 por PCR.....	66
Figura 11 - Amplificação da ORF CLIBASIA_04790.....	66
Figura 12 - Amplificação da ORF ED07_RS0204515 com os <i>primers</i> MFSD9.f e MFSD9.r.....	67
Figura 13 - Perfil eletroforético de digestão das construções em pGEM ®-T easy com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>PstI</i>	68
Figura 14. - Perfil eletroforético de restrição com as enzimas <i>BamHI</i> e <i>SacI</i>	69
Figura 15 - Perfil eletroforético de plasmídeos após a digestão com as enzimas de restrição <i>BamHI</i> , <i>SacI</i> e <i>SphI</i>	70
Figura 16 - Amplificação da ORF SC1_gp060 de Las e Lam a partir das construções em pGEM ®-T easy.....	71
Figura 17 - Perfil eletroforético após digestão com enzimas de restrição das construções em pET28a.....	72
Figura 18 - Perfil eletroforético do produto da digestão dos plasmídeos pMD18 com as enzimas de restrição <i>BamHI</i> e <i>SacI</i>	73
Figura 19 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a colicina Ia de isolados de Las.....	75

Figura 20 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a colicina Ia de isolados de Lam.....	76
Figura 21 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a colicina Ia de isolados de Las com base no local do isolado.....	77
Figura 22 - Alinhamento das sequências de aminoácidos das ORFs relativas a colicina Ia do isolado Lam São Paulo.....	78
Figura 23 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a colicina Ia de isolados de Lam para a confirmação da inserção de 138 pb.....	79
Figura 24 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a lisozima de isolados de Las.....	80
Figura 25 - Alinhamento dos 60 resíduos da porção N-terminal das ORFs de colicina Ia de isolados de Las.....	83
Figura 26 - Cinética de crescimento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) expressando lisozimas de Las.....	88
Figura 27 - Área abaixo da Curva de Progresso da Densidade Ótica (AACPD) para lisozima de Las.....	89
Figura 28 - Alinhamento das sequências de aminoácidos das ORFs relativas a lisozima Ia dos isolados 3PA e 4PA.....	90
Figura 29 - Cinética de crescimento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) expressando colicinas putativas de Las e Lam.....	93
Figura 30 - Área abaixo da Curva de Progresso da Densidade Ótica (AACPD) para colicinas putativas de Las e Lam.....	94
Figura 31 - SDS-PAGE das proteínas recombinantes lisozima de Las.....	96
Figura 32 - Western-blotting das proteínas recombinantes lisozima de Las.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos genomas de Lcr, Las e Lam.....	27
Tabela 2 – Descrição das linhagens bacterianas utilizadas.....	41
Tabela 3 – Descrição dos vetores utilizados.....	42
Tabela 4 - Composição dos meios de cultura.....	43
Tabela 5 - Fonte de DNA utilizado nas amplificações de PCR.....	45
Tabela 6 – Descrição dos iniciadores utilizados para a amplificação das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515.....	46
Tabela 7 - Iniciadores utilizados para o sequenciamento interno das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515.....	52
Tabela 8 - Genes e proteínas homólogos de Las e Lam com predição para colicina la obtidos a partir do NCBI.....	58
Tabela 9 - ORFs similares a SC1_gp060 do isolado Las UF506 (acesso ADV02637) identificadas no NCBI nas bactérias Las e Lam.....	59
Tabela 10 - ORFs de Las, Lam, Laf e Lcr com predição para Lisozima.....	61
Tabela 11 - ORFs similares a CLIBASIA_04790 (acesso ACT57529.) do isolado Las psy62 identificadas no NCBI nos genomas de Las, Lam e Laf.....	62
Tabela 12 - Predição de hélices transmembranares nas colicinas de Las e Lam e lisozimas de Las.....	81
Tabela 13 - Predição de peptídeo sinal nas colicinas de Las e Lam e lisozimas de Las.....	83
Tabela 14 - Predição de homologia da estrutura terciária nas colicinas la de Las e Lam e lisozimas de Las.....	84
Tabela 15 - Comparação dos valores médios de absorbância dos clones expressando lisozima.....	86
Tabela 16 - Resultados da análise de variância na indução da lisozima.....	87
Tabela 17 - Comparação dos valores médios de absorbância dos clones de colicina.....	91
Tabela 18 - Resultados da análise de variância na indução da colicina.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa - aminoácidos

ABC - *ATP-binding cassette*

ACES - Ácido N-2-Acetamido-2-Aminoetanosulfônico

AgNO₃ – Nitrato de Prata

Amp – Ampicilina

BLAST - *Basic Local Alignment Search*

BLO - *bacterial-like organisms*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

Can – Canamicina

Cm - Cloranfenicol

COG - *Clusters of Orthologous Groups*

DAB – 3,3-Diaminobenzidina

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

DTT - *Dithiothreitol*

FI – Fração insolúvel

FS – Fração solúvel

Gm - Gentamicina

HCl – Ácido Clorídrico

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HLB - Huanglongbing

IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida

KOH – Hidróxido de Potássio

LB – Luria Bertani

M - Molar

Mpb - Mega pares de base

MLO - *Mycoplasma-like organism*

NaCl – Cloreto de Sódio

Na₂CO₃ – Carbonato de Sódio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

ORF – *Open Reading Frame*

P.A. – Puro para análise

PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

pb – pares de base

PCR – *Polimerase Chain Reaction*

PIB - Produto Interno Bruto

pH – Potencial Hidrogeniônico

R – Resistente

RNA – *Ribonucleic acid*

ROS - *Reactive Oxygen Species*

rDNA – *ribosomal Deoxyribonucleic acid*

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

SSTI - Sistema de Secreção tipo I

SSTIII - Sistema de secreção tipo III

SSTIV - Sistema de secreção tipo IV

TAE – *Tris Acetate EDTA*

TBS - *Tris-buffered saline*

TMD – *Transmembrane Domains*

TMHMM - *Tied Mixture Hidden Markov Models*

TNM-FH - *Trichoplusia ni Medium Composition*

Trna – RNA transportador

USDA – *United States Department Of Agriculture*

X-GAL – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. A citricultura no Brasil.....	21
1.2. O Huanglongbing.....	22
1.3. <i>Liberibacter</i> spp.....	24
1.4. Características genômicas de Las, Lam e Lcr.....	27
1.5. Sistemas de secreção.....	28
1.5.1. Pili e sistema flagelar.....	29
1.6. Profagos nas <i>Liberibactérias</i>	30
1.7. Competição bacteriana.....	32
1.7.1. Ocorrência simultânea de Lam e Las.....	34
1.8. Colicinas.....	35
1.9. Lisoenzimas	37
1.10. Caracterização de genes em Las por genômica funcional.....	38
2. OBJETIVOS.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1. Microrganismos e vetores de clonagem.....	41
3.2. Meios de cultura e condições de cultivo.....	43
3.3. Métodos de manipulação de DNA.....	44
3.3.1. Extração de DNA Genômico e Plasmidial de folhas de vinca e laranja doce infectadas por Las e Lam.....	44
3.3.2. Seleção de ORFs e Construção de <i>primers</i>	45
3.3.3. Amplificação das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515.....	47
3.4. Clonagens	48
3.4.1. Clonagem em vetor pGEM® -T Easy.....	48
3.4.2. Subclonagem em vetor pUFR071	49
3.4.3. Clonagem em vetor de expressão pET28a	49
3.4.4. Clonagem de fragmento do Fitoplasma IX em pUFR071 e pET28a como controle não tóxico	50
3.4.5. Sequenciamento	51
3.5. Ferramentas de predição	53
3.6. Transformação em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) e <i>L. crescens</i> BT-1.....	53
3.7. Expressão Heteróloga.....	54
3.7.1. Expressão Heteróloga por indução das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 em <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	54
3.8. Precipitação de Proteínas.....	56
3.9. Obtenção de frações proteicas solúvel e insolúvel.....	56
3.10. Western-blotting	57
3.11. Análise estatística.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.1. ORFs colicina e lisoenzima	58
4.1.1. Possíveis bacteriocinas em <i>Liberibactérias</i>	58

4.1.2. Possíveis lisozimas em Liberibactérias.....	60
4.2. Amplificação das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515.....	64
4.3. Clonagem em vetor pGEM® - T Easy.....	67
4.4. Clonagem por restrição em pUFR071.....	68
4.5. Clonagem por restrição em pET28a.....	71
4.6. Construção de um controle de expressão.....	74
4.7. Análise de sequenciamento	73
4.7.1. Análise de sequência das colicinas de Las.....	74
4.7.2. Análise de sequência da colicina de Lam.....	77
4.7.3. Análise de sequência das lisozimas de Las.....	80
4.8. Análises em ferramentas de predição de função.....	81
4.8.1. Predição de domínio transmembrana – TMHMM.....	81
4.8.2. Identificação de peptídeo sinal – SignalP.....	82
4.8.3. Predição de homologia de estrutura terciária – HHpred.....	84
4.9. Expressão heteróloga das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> BL21 (DE3) utilizando construções em pET28a.....	85
4.9.1. Expressão heteróloga das lisozimas.....	86
4.9.2. Expressão heteróloga das colicinas.....	90
4.10. Análise da produção de proteínas por SDS-PAGE e Western-blotting.....	95
4.10.1. SDS-PAGE e Western-blotting - lisozimas.....	95
4.10.2. SDS-PAGE e Western-blotting - colicinas.....	97
5. CONCLUSÕES.....	99
6. PERSPECTIVAS	100
6.1. Utilização de lisozimas e bacteriocinas no controle de doenças em plantas.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
APÊNDICES.....	117

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de laranja do mundo. Na safra 2016/2017 foram produzidas 245 milhões de caixas da fruta em todo país (NEVES; TROMBIM, 2017; IBGE, 2017). De acordo com o USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), o Brasil é responsável por 76% do comércio mundial da laranja, sendo o maior fornecedor global do produto e também responsável por 34% da produção mundial da fruta e 56% da produção mundial de suco (NEVES; TROMBIM, 2017). Estes números, além de consolidar o Brasil como líder global do mercado da laranja, se traduzem na importância econômica para o país, com a geração de cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos e um PIB (Produto Interno Bruto) que gira em torno de US\$ 6,5 bilhões de dólares (NEVES; TROMBIM, 2017). Contudo, assim como outras culturas, a citricultura enfrenta limitações e os problemas fitossanitários representam historicamente os maiores temores aos citricultores.

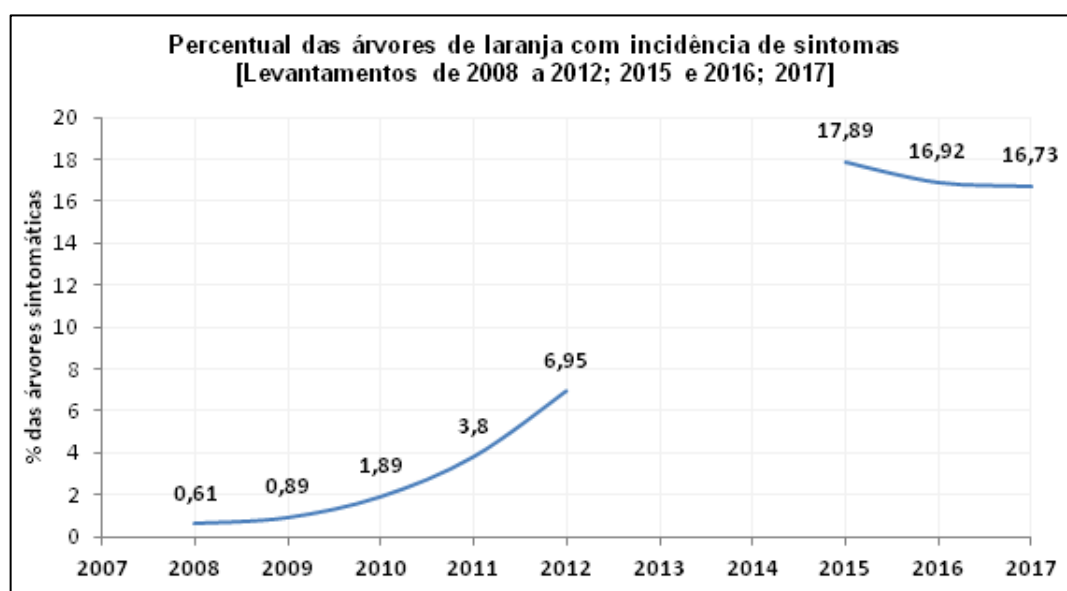
O Huanglongbing (HLB), uma das doenças mais severas dos citros (COLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005; LOPES et al., 2008), foi descoberto pela primeira vez no Brasil no estado de São Paulo em 2004 (TEIXEIRA et al., 2005; BOVÉ, 2006), e em 2005 nos Estados Unidos, no estado da Flórida, dois dos principais produtores mundiais de citros (BELASQUE-JUNIOR et al., 2009), sendo associado a bactérias Gram-negativas, α -proteobactérias, fastidiosas e limitadas ao floema, denominadas *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. L. americanus* (Lam) e *Ca. L. africanus* (Laf) (BOVÉ, 2006). Além da presença de Las e Lam, no Brasil foi relatado ainda um fitoplasma do grupo IX, que causa em citros os mesmos sintomas que as liberibactérias (TEIXEIRA et al., 2008).

A disseminação do HLB no Brasil é feita pelo vetor psíldeo *Diaphorina citri* (COLETTA-FILHO et al., 2004) que ao se alimentar do floema dos citros adquire a bactéria e a transmite para outras plantas após o período de latência. No psíldeo a colonização da bactéria é sistêmica, ou seja, ela se multiplica em órgãos como a glândula salivar, o canal alimentar e o intestino (AMMAR et al., 2014).

Os sintomas do HLB são caracterizados por manchas amareladas nas folhas denominadas de mosqueado, com intensa queda de frutos e frutos de baixa qualidade (BELASQUE-JUNIOR et al., 2009). O manejo adequado do HLB requer o plantio de mudas provindas de viveiros telados, inspeção e a erradicação de plantas

sintomáticas, e o controle químico de insetos vetores (BELASQUE-JUNIOR et al., 2009). Entretanto, o sucesso destas práticas está limitado às propriedades que apresentam condições favoráveis e adequadas ao controle do HLB (BELASQUE-JUNIOR et al., 2009), o que limita sua eficácia e mantém a necessidade de ações de controle regional do HLB (BASSANEZI et al., 2013) devido ao aumento da incidência ao longo da epidemia (Figura 1). Além disso, estratégias biotecnológicas com base nas informações genômicas de Las, Lam e *Liberibacter crescens* (Lcr) disponíveis, se apresentam como perspectivas promissoras no combate à doença.

Figura 1. Progresso temporal da incidência de plantas com sintomas de HLB no estado de São Paulo.



Fonte: Fundecitrus (2017)

Os genomas completos de Las e Lam foram obtidos respectivamente em 2009 (DUAN et al., 2009) e 2014 (WULFF et al., 2014), possibilitando um maior entendimento dos possíveis mecanismos utilizados pela bactéria, visto que as bactérias patogênicas causadoras do HLB não são cultiváveis em meio de cultura axênico (TEIXEIRA et al., 2010). O tamanho do genoma de Las, 1.23 Mbp (Mega pares de base) (isolado Psy62) e Lam 1.20 Mb (isolado São Paulo) são consistentes com o de patógenos bacterianos intracelulares obrigatórios (< 1.5 Mb) que sofreram redução evolutiva de genoma (DUAN et al., 2009; WULFF, et al., 2014; ANDERSSON; KURLAND, 1998). Apesar do conteúdo do genoma de patógenos intracelulares ser

composto de poucas ou nenhuma repetição e elementos genéticos móveis se comparados as formas de cultura livre da mesma família, bacteriófagos e elementos transponíveis são geralmente encontrados e podem carregar determinantes críticos de patogenicidade (WULFF et al., 2014).

No genoma do isolado UF506 de Las, foram encontrados dois profagos, denominados de SC1 e SC2. Enquanto SC1 parece ser completamente funcional, SC2 parece ser uma forma degenerada deste primeiro (ZHANG et al., 2011). A região de genes precoces dos dois profagos é 93% idêntica, enquanto que regiões únicas para cada um dos profagos são de genes tardios (ZHANG et al., 2011). Em SC1 foram encontrados possíveis genes de lise, tais como possíveis holina e endolisina (FLEITES et al., 2014), e fora da região do profago foi anotada uma lisozima (CLIBASIA_04790). SC1 codifica uma possível colicina Ia (SC1_gp060) dentre os genes tardios e SC2 codifica uma possível proteína de imunidade (imla) (SC2_gp255), garantindo assim, no caso de expressão da colicina, sobrevivência das células bacterianas que carregam SC2 (ZHANG et al., 2011).

Apesar de pouca informação disponível em relação aos papéis biológicos e as interações dos dois profagos, suspeita-se que interferem na gama de hospedeiros e culturabilidade de Las (FLEITES et al., 2014) e a expressão de genes pela bactéria como bacteriocinas e lisozimas na forma lítica do profago, pode estar ligada a competitividade entre as bactérias causadoras do HLB, assim como acontece em outros sistemas, como no trato digestivo de mamíferos entre diferentes estirpes de *Enterococcus faecalis* que produzem e que não produzem bacteriocinas (KOMMINENI et al., 2015).

A despeito do HLB e seu impacto na citricultura mundial, estudos funcionais para elucidar a função de genes de Las são necessários na compreensão molecular da infecção, colonização e desenvolvimento de sintomas em citros. O fato das Liberibactérias associadas a doenças em plantas não estarem disponíveis em cultura axênica, impede sua análise genética direta. A disponibilidade de informações do genoma destas bactérias, entretanto, permite o uso de sistemas heterólogos para expressão proteica e para a realização de estudos funcionais assim como realizados para diversos genes (VAHLING; DUAN; LIN, 2010; FLEITES et al., 2014; JAIN et al, 2015; JAIN et al., 2018)

1.1. A citricultura no Brasil

São Paulo, no Brasil, e Flórida, nos EUA (Estados Unidos da América), são os dois maiores produtores de laranja do mundo. Enquanto que no primeiro, a citricultura começou a ganhar força a partir da década 1910 com a derrocada do café, no segundo, o agronegócio se desenvolve desde o século XIX (PAULINO; FABRINI, 2008). Foi a partir de 1960, com a industrialização do suco concentrado e o início das exportações para os EUA, que a citricultura paulista começou a traçar o caminho para sua consolidação, em 1980, tornando o Brasil o maior produtor e exportador mundial de suco de laranja concentrado congelado (PAULILLO, 2006). Neste período o Brasil superou os EUA, antigo maior produtor mundial, não somente em produção, mas também em tecnologia dos citros, e o preço da laranja, alavancado pela queda de produção na Flórida devido a geadas que atingiram o estado de 1977 a 1989, fez com que a área cultivada do parque citrícola paulista crescesse a exorbitantes 18% ao ano (NEVES et al, 2010). O período de 2004 a 2010 foi marcado por grandes variações no mercado mundial da laranja, visto que vários furacões atingiram a Florida, devastando o parque citrícola. Isso fez com que os estoques mundiais diminuíssem, e o preço da laranja voltasse a subir. No fim do período, em 2010, a produção do parque citrícola brasileiro fechou em 397 milhões de caixas de laranja. (NEVES et al., 2010).

Devido principalmente à problemas fitossanitários, pôde-se notar uma oscilação e queda na produção citrícola no Brasil. Enquanto que em 2011 obteve-se produção maior em relação aos anos anteriores, a partir de 2012 o volume de produção seguiu uma tendência de declínio até 2016, quando a produção fechou em 15,9 milhões de toneladas de laranja produzidas (IBGE, 2017). Ainda assim, a citricultura brasileira é o quinto agronegócio que mais produz no país, ficando atrás somente da cana-de-açúcar, soja, milho e mandioca (IBGE, 2017).

Cerca de 60% do suco de laranja consumido no mundo é produzido por indústrias no Brasil e as exportações representam 98% da produção nacional (NEVES et al.,2010). A citricultura é a principal fonte de renda em muitos municípios, tanto pela presença de grandes fazendas e indústrias de processamento, quanto pela presença de pequenos produtores, gerando 200 mil empregos diretos e indiretos (NEVES, 2010). Durante a safra 2016/2017, a citricultura foi o agronegócio que mais gerou

vagas no Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro, sendo 45.508 postos de trabalho (CITRUSBR, 2017). Estes números indicam e reforçam a importância da citricultura para o país.

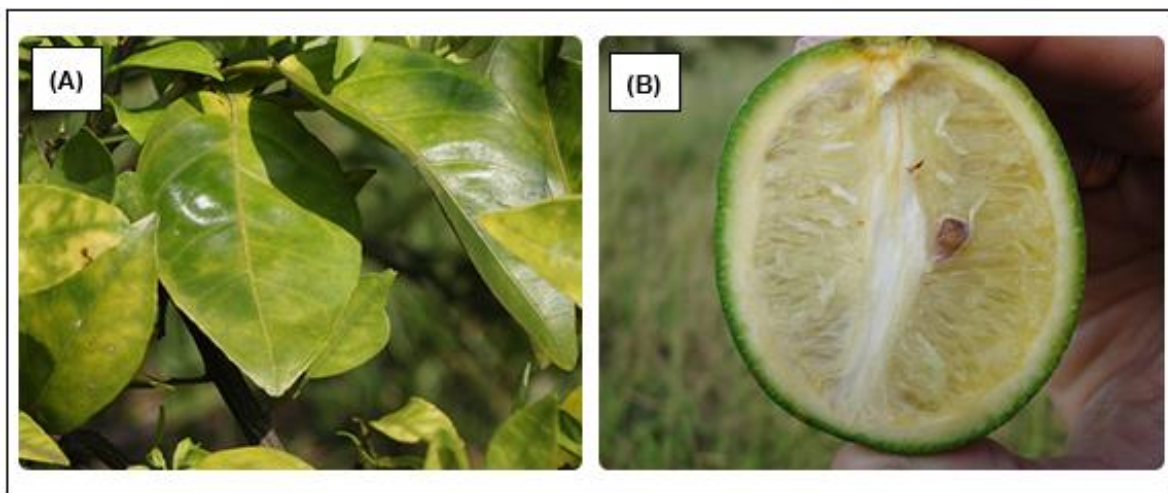
1.2. O Huanglongbing

Nas últimas décadas 40 milhões de árvores do parque citrícola paulista e mineiro foram erradicadas devido principalmente a problemas fitossanitários (NEVES, 2010). O HLB, também conhecido como greening, foi relatado no continente americano no início do século XXI, no Brasil e na Flórida, sendo atualmente a doença mais destrutiva da citricultura mundial (TEIXEIRA et al., 2005; RAMSEY et al., 2017).

Com sua primeira menção no século XX na China (REINKING, 1919), o HLB (do chinês: “doença do ramo amarelo”) foi relatado no Brasil pela primeira vez no ano de 2004 em Araraquara, no Estado de São Paulo, em 2005 em Minas Gerais e 2007 no Estado do Paraná (COLLETTA-FILHO et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2005; BELASQUE-JUNIOR et al., 2009). Inicialmente diagnosticado como deficiência mineral, o HLB foi em seguida demonstrado ser transmissível via enxertia (LIN, 1956) assim como também via insetos vetores, os psílídeos (CAPOOR; RAO; VISWANATH, 1967).

O HLB possui sintomas característicos que podem ser vistos durante o ano todo (FUNDECITRUS, 2009). Uma árvore que adquire o HLB apresenta ramos amarelados (Figura 2A) e as folhas atingidas apresentam um padrão de áreas verdes e amarelas com delimitações entre as cores; a este fenômeno dá-se o nome de “mosqueado” ou clorose assimétrica (GOTTWALD et al., 2007). Conforme a doença evolui, os sintomas começam a atingir toda a copa da planta e por mais que novos brotos surjam, as folhas serão pequenas, amarelas e a nervura pode ficar grossa e mais clara (FUNDECITRUS, 2009). Sintomas de deficiência nutricional também podem aparecer, além de seca e morte de ponteiros (FUNDECITRUS, 2009). Os frutos presentes nos ramos sintomáticos podem apresentar-se assimétricos, com tamanho reduzido, incompletamente maduros e com sabor amargo. Cortes perpendiculares destes frutos revelam ainda sementes abortadas e columela alaranjada (Figura 2B) (BELASQUE-JUNIOR, 2009).

Figura 2. Sintomas de HLB. **(A)** Clorose assimétrica (“Mosqueado”) **(B)** Fruto assimétrico, incompletamente maduro com semente abortada.



Fonte: Fundecitrus

A infecção pelas bactérias causadoras do HLB é sistêmica e segue o fluxo da seiva do floema, movendo-se do local da infecção até as raízes, e posteriormente para a restante da planta (WANG et al., 2017). Apesar de o HLB não causar a morte das árvores, árvores novas infectadas não chegam a produzir, podendo chegar a uma redução de 100% na produção (BASSANEZI et al., 2006).

Em torno de 16,7% das árvores do cinturão citrícola são sintomáticas para HLB (Figura 1). Este valor, não retrata o verdadeiro cenário, visto que a doença tem um período de incubação no qual os sintomas não aparecem, ou seja, a planta está infectada, no entanto a bactéria ainda não se multiplicou o suficiente para que a planta demonstre sintomas (BESLAQUE-JUNIOR et al., 2009). O período de incubação do HLB varia conforma alguns fatores, como o ambiente, a idade e espécie ou variedade da planta, e espécie e concentração de *Candidatus Liberibacter* spp. e estima-se que seja entre 6 a 12 meses (BELASQUE-JUNIOR et al., 2009).

Não existem variedades ou porta-enxertos resistentes ao HLB e as medidas viáveis para o controle da doença são principalmente preventivas (BELASQUE-JUNIOR et al., 2010; FOLIMONOVA et al., 2009). No caso do HLB, a poda dos ramos que apresentam os sintomas da doença é ineficaz, visto que a bactéria é distribuída por toda a planta pelo fluxo da seiva e sua distribuição é irregular (LOPES; BASSANEZI, 2007; ACHOR et al., 2010). Tratamentos com antibióticos apesar de se

mostrarem temporariamente eficazes na remissão de sintomas, são inviáveis para a utilização em pomares comerciais, pois quando o tratamento é interrompido a doença ressurge, além de apresentarem alto risco ambiental (BOVÉ, 2006; BELASQUE-JUNIOR et al., 2009).

Medidas preventivas visando o controle do HLB envolvem o plantio de mudas sadias provenientes de viveiros telados, eliminação de plantas doentes, controle do inseto vetor e eliminação de fontes secundárias de inoculo, como a murta (*Murraya paniculata*) e outras membros da família Rutaceae (BELASQUE-JUNIOR et al., 2009; FANCELLI et al., 2018). Ainda mais, em questão de medidas corretivas, estudos das bactérias patogênicas ajudam a elucidar aspectos relevantes de patogênese e respostas de defesa associadas aos hospedeiros, ajudando assim no desenvolvimento de métodos e estratégias biotecnológicas para o controle efetivo da doença.

1.3. *Liberibacter* spp.

Os organismos causadores do HLB foram classificados inicialmente como MLO (*mycoplasma-like organism*) por Laflèche e Bové (1970) por conta da presença de corpúsculos nos tubos crivados do floema de citrus. Mais tarde, nestas mesmas estruturas foram identificados envoltórios de aproximadamente 25 nm de espessura, mais espessos que os encontrados em micoplasmas que variam de 7 a 10 nm, e presença de peptídeoglicano, o que indicou que se tratavam de bactérias Gram-negativas (GARNIER et al., 1984; JAGOEIX, et al., 1994).

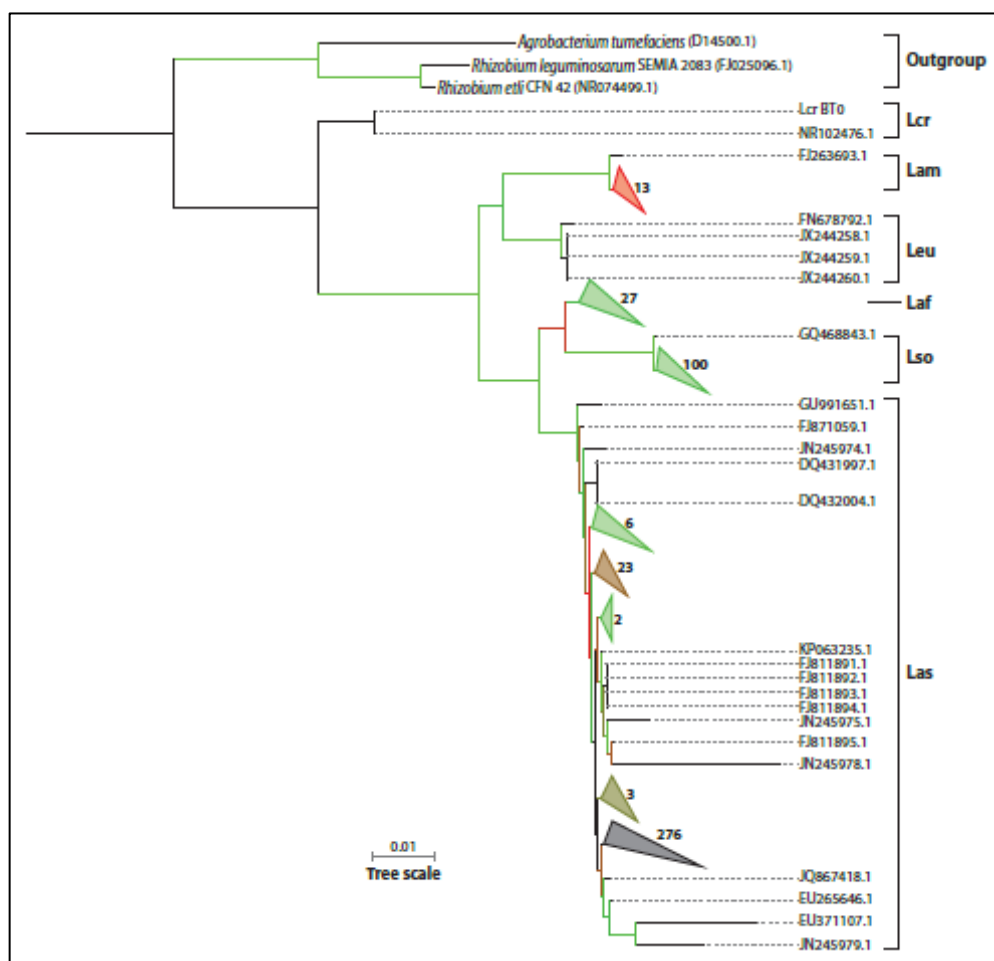
Os organismos desse grupo vivem em íntima associação com seus hospedeiros eucariotos, e também adquiriram a capacidade de sobreviver e crescer dentro de insetos artrópodes (JAGOEIX et al., 1994). Por serem restritas aos vasos crivados do floema, também chamados de vasos liberianos, e incultiváveis em meio de cultura axênico, foram chamadas de *Candidatus* *Liberibacter* (JAGOEIX et al., 1994; MACHADO et al., 2010), seguindo a proposta de nomenclatura estabelecida por Murray e Schleifer (1994).

Existem 6 espécies de *Liberibacter* conhecidas (Figura 3), *Candidatus* *Liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. L. americanus* (Lam), *Ca. L. africanus* (Laf), *Ca. L. europaeus* (Leu), *Ca. L. solanacearum* (Lso) e *Liberibacter crescens* (Lcr), sendo esta última a única capaz de crescer em cultura axênico (JAGOEIX et al., 1994;

TEIXEIRA et al., 2005; GARNIER et al., 2000a; THOMPSON et al., 2013; LIEFTING et al., 2009; FAGEN et al., 2014). Das espécies citadas acima Las, Lam e Laf, são associadas ao HLB, Lso causa doenças em solanáceas e Leu tem uma relação endofítica com seus hospedeiros (RADDADI et al., 2011; LIEFTING et al., 2009). Lcr embora tenha sido isolada de planta, não é associada à ocorrência de doenças (LEONARD et al., 2012).

Devido a não disponibilidades desses patógenos em meio de cultura, o postulado de Koch não pôde ser devidamente completado. No entanto, existem muitas evidências que apontam as Liberibactérias como agentes causais do HLB e outras doenças em plantas (BOVÉ, 2006; GARNIER et al., 2000b; JAGOUÉIX et al., 1994; TEIXEIRA et al., 2005; HANSEN et al., 2008; LIEFTING et al., 2008, RADDADI et al., 2011; LEONARD et al., 2012).

Figura 3. Máxima Verossimilhança da árvore filogenética de *Candidatus Liberibacter* spp. com base na sequência do gene 16S rDNA.



Fonte: Wang et al. (2017)

Devido à natureza fastidiosa das liberibactérias, pesquisas com estes organismos são limitadas a microscopia eletrônica e análises genômicas (BOVÉ, 2006; ZHANG et al., 2011; LIN et al., 2011). Os genomas completos das liberibactérias Las e Lam foram obtidos respectivamente em 2009 e 2014 (DUAN, et al., 2009; WULFF, et al., 2014) possibilitando um maior entendimento sobre os patógenos. O genoma de Lcr foi obtido em 2012 (LEONARD et al., 2012). A disponibilidade da cultura de Lcr e o fato de ter seu genoma sequenciado abrem a perspectiva de genômica funcional com este representante do gênero das Liberibactérias.

1.4. Características genômicas de Las, Lam e Lcr

A diferença do tamanho do genoma de Las, Lam e Lcr, pode ser a responsável pela não culturabilidade das duas primeiras e pela não virulência da última (LEONARD et al., 2012). Enquanto que o tamanho do genoma de Lcr é de 1,50 Mpb (Mega pares de base), os genomas de Las e Lam possuem 1,23 Mpb e 1,19 Mpb respectivamente (DUAN, et al., 2009; WULFF, et al., 2014; LEONARD et al., 2012) (Tabela 1).

Em relação ao crescimento, dos 314 genes identificados como essenciais em Lcr, 74 codificam para genes hipotéticos, com função desconhecida, e 238 possuem homólogos em Las (LAI et al., 2016).

Tabela 1. Características gerais dos genomas de Lcr, Las e Lam

Característica	Lcr	Las	Lam
Tamanho (pb)	1,504,659	1,227,204	1,195,201
Conteúdo GC%	35,85	36,50	31,12
Operons Rrna	9	3	3
Trna	46	44	45
Genes preditos	1433	1186	-
Genes que codificam proteínas	1359	1136	983
Genes atribuídos ao COG	857	836	800

Fonte: Modificado de Duan et al. (2009); Wulff et al. (2014) e Leonard et al. (2012)

A diferença de tamanho de genoma encontrada entre Lcr, Las e Lam pode ser consequência da adaptação ao ambiente intracelular dos hospedeiros. Durante esta adaptação bactérias podem tomar dois caminhos evolucionários distintos. No primeiro, a célula hospedeira pode se tornar dependente dos produtos fornecidos pelas atividades genômicas da bactéria; neste caso, a bactéria e a célula hospedeira são ligadas por uma dependência simbiótica que progressivamente se estreita pela tendência de perda de genes por um ou outro genoma. Esta perda é consequência de redundância ou sobreposição de funções genômicas e, ainda podem desenvolver uma relação tão íntima quanto aquela existente entre o núcleo eucarionte e a mitocôndria (ANDERSSON; KURLAND, 1998). No segundo caminho, a bactéria pode se tornar um parasita obrigatório e não oferecer nenhum benefício à célula hospedeira. Neste caso é desenvolvido um padrão de patogênese e estratégias ofensivas.

A dependência causada pela perda de genes sobrepostos pode fazer com que a bactéria seja incapaz de crescer fora das dependências do hospedeiro (ANDERSSON; KURLAND, 1998). No entanto, além dos patógenos intracelulares obrigatórios, existem os facultativos. Enquanto que os obrigatórios não sobrevivem fora de sua célula hospedeira, os facultativos podem viver e se reproduzir tanto fora quanto dentro da célula hospedeira (LEON-SICAIROS et al., 2015).

Levando-se em consideração que Lcr possa ter optado pela rota facultativa, podendo tanto se desenvolver fora quanto dentro de hospedeiros, Las e Lam parecem ter sofrido adaptação ao ambiente intracelular de citos e psíldeos, se tornando patógenos intracelulares obrigatórios, com perda de genes essenciais ao seu crescimento axênico, e manutenção ou aquisição de genes responsáveis pela sobrevivência dentro dos hospedeiros, incluindo aqueles relacionadas a colonização do hospedeiro e exploração de recursos.

1.5. Sistemas de secreção

Interações de patógenos bacterianos com suas células hospedeiras são mediadas por proteínas chamadas de efetoras que podem ser tanto localizadas na superfície bacteriana ou secretadas por estas no meio extracelular (HUECK et al., 1998; GREEN; MECSAS, 2016). Essas proteínas efetoras frequentemente são responsáveis por, entre outras, suprimir as defesas dos hospedeiros ou manipular processos de desenvolvimento dentro do hospedeiro para benefício do patógeno (JONES; DANGL, 2006; WANG et al., 2017). Apesar da quantidade e diversidade de proteínas efetoras secretados pelas bactérias, existem apenas poucas vias pelas quais estas são secretadas (HUECK et al., 1998).

O sistema de secreção tipo I (SSTI), encontrado em muitas bactérias gram-negativas, é responsável pelo transporte de pequenas moléculas, como antibióticos e toxinas, para fora da célula e também funciona como um efluxo multidrogas (GREEN; MECSAS, 2016; DUAN et al., 2009). O SSTI em bactérias gram-negativas, geralmente é composto de três componentes proteicos. Dois destes componentes, HlyD e PrtD, estão localizados na membrana interna e outro, chamado de TolC, gene responsável pela exportação de colicinas, atravessa tanto a membrana interna quanto o periplasma (KORONAKIS; ESWARAN; HUGHES, 2004). O sistema de secreção tipo

III (SSTIII), geralmente encontrado em bactérias patogênicas Gram-negativas e simbiontes, é responsável pelo transporte de proteínas efetoras. O Sistema de Secreção Tipo IV (SSTIV) é responsável por sistema de conjugação de DNA bacteriano e secreção de diversos substratos em bactérias Gram-negativas (GREEN; MECSAS, 2016). Ambos os SSTIII e SSTIV não foram encontrados nos genomas de Las e Lam, assim como esperado para patógenos cuja rota de infecção se dá pela injeção direta por psilídeos dentro da célula vegetal (DUAN et al., 2009).

1.5.1. Pili e sistema flagelar

As organelas conhecidas como pilus ou pili são estruturas superficiais bacterianas não flagelares que se configuram como importantes fatores de virulência para muitas bactérias Gram-Negativas (HOSPENTHA; COSTA; WARKSMAN, 2017).

As estruturas longas, finas e compostas de polímeros de proteínas carregam diversas funções, tais como contato entre superfície da célula hospedeira e a bactéria ou entre bactérias vizinhas, no caso de pili conjugativo, ou infecção, motilidade bacteriana e formação de biofilme, quando o contato é feito por outro tipo de pili (THANASSI et al., 2012; ARUTYUNOV; FROST, 2013; VAN GERVEN et al., 2015). Já o sistema flagelar, composto de estruturas longas envolvidas em motilidade, permite que bactérias sobrevivam a uma ampla gama de condições ambientais, assim como também adesão a substratos formação de biofilme e virulência (SOUTOURINA; BERTIN, 2003).

No genoma de Las foram encontrados genes envolvidos em motilidade celular, tais como Pili Tipo IV e sistema flagelar, no entanto alguns dos genes de biossíntese flagelar foram considerados pseudogenes (DUAN et al., 2009). Nas outras Liberibactérias também foram encontrados genes estruturais para a produção de pili e flagelos (WULFF et al., 2014; DUAN et al., 2009). Um trabalho desenvolvido por Zou et al. (2012) encontrou genes codificando para flagelinas (Fla) com um domínio conservado de 22 aminoácidos no genoma de Las. Experimentos mostraram que a motilidade de um mutante de *Sinorhizobium meliloti* com deleção de genes *fla* (flagelina) foi parcialmente restaurada pela expressão constitutiva de Fla_{Las}, e a expressão transiente mediada por *Agrobacterium thumefaciens* em *Nicotiana benthamiana* levou a formação de calose e morte celular. Hao et al. (2014) mostraram

que um gene encontrado no genoma de Lso codifica para um domínio flagelina (flg22_{Lso}) e este compartilha identidade com as flagelinas encontradas em Las, Lam e Lcr. Esta proteína quando expressa em *Nicotiana benthamiana* por *Agrobacterium tumefaciens* também desencadeou resposta imune, levando a aparição de calose nas folhas. Essas informações levam a concluir que as flagelinas codificadas por Liberibactérias desempenham um papel importante no desencadeamento da resposta imune dos hospedeiros citros, levando assim ao início de uma guerra travada por ambos, hospedeiro e patógeno, onde de um lado as plantas hospedeiras reconhecem os PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) e ativam mecanismo de defesa, e por outro as bactérias utilizam genes como peroxidases, muitas vezes adquiridas por transferência horizontal via profagos, para suprimir ROS (*reactive oxygen species*) (JAIN et al., 2015). A doença é resultado da vitória das estratégias utilizadas pelo patógeno.

1.6. Profagos nas Liberibactérias

Vírus de DNA de fita dupla, assim como das famílias *Shiiviridae*, *Podoviridae* e *Myoviridae*, frequentemente estão associados a genomas de bactérias fitopatogênicas e quando as infectam são chamados de bacteriófagos ou fagos (VARANI et al., 2013; WOMMACK; COLWELL, 2000; KIDAMBI; RIPP; MILLER, 1994).

Quando infectam bactérias, os fagos podem seguir dois caminhos na célula (VARANI et al., 2013), no primeiro, chamado de ciclo lítico, o fago se replica efetivamente e lisa a célula bacteriana hospedeira, já no segundo, chamado de ciclo lisogênico, o fago se mantém em um estado não lítico (FROST et al., 2005), no qual o seu DNA se integra por recombinação ao genoma da bactéria hospedeira, se tornando assim um profago (BRUSSOW; CANCHAYA; HARDT, 2004). Apesar de não serem infectivos, alguns genes acessórios e regulatórios dos profagos podem ser expressos para a manutenção do estado dormente (KOIDE et al., 2004).

O profago pode conferir patogenicidade à célula hospedeira bacteriana, através de propriedades fenotípicas que são adquiridas através dos chamados genes de conversão lisogênica (BRUSSOW; CANCHAYA; HARDT, 2004; ZHANG et al., 2011). Desta maneira, os profagos são os maiores responsáveis por variabilidade genética

nas bactérias hospedeiras e desempenham um importante papel na evolução de patogenicidade bacteriana (ZHOU et al., 2011; FORTIER; SEKULOVIC, 2013).

Nos genomas das cepas psy62 e UF506 de Las foram identificados profagos classificados como do tipo 1 e 2, sendo FP1 e FP2 e SC1 e SC2 respectivamente (ZHOU et al., 2011). No genoma de UF506, SC1 apresenta-se como um profago “temperado” totalmente funcional, com ciclo lítico que possivelmente pode ser ativado em infecções em plantas, enquanto que SC2 encontra-se como uma forma degenerada deste primeiro, replicando-se como um plasmídeo de excisão (ZHANG et al., 2011) com ausência de genes do ciclo lítico, no entanto contendo diversos potenciais genes de conversão lisogênica como peroxidases (ZHANG et al., 2011).

Wulff et al. (2014) encontraram no genoma de Lam São Paulo, dois profagos, SP1 e SP2, sendo que os mesmos estão arranjados em tandem no genoma. Assim como SC2, SP2 também possuem genes de conversão lisogênica para replicação como plasmídeo de excisão (WULFF et al., 2014). No genoma de Lcr e Lso também foram descobertos dois possíveis profagos, sendo do tipo 1 e 2, LC1 e LC2 e P-I e P-II respectivamente (LEONARD et al., 2012; LIN et al., 2011; FAGEN et al., 2014) que diferentemente de SC1 e SC2, não são homólogos e não compartilham similaridade com os profagos descritos em Las e Lam (WULFF et al., 2014; LEONARD et al., 2012). No entanto a estrutura de LC1 e LC2 pode indicar que possuem potencial para ativar o ciclo lítico (FAGEN et al., 2014).

Os genomas dos isolados de Las depositados no Genbank, Las UF506 (Flórida), Psy62 (Flórida) e gxpsy (Guangxi, China) possuem os dois profagos, enquanto que A4 (Guangdong, China), HHCA (Califórnia), FL17 (Flórida) e YCpsy (Guangdong, China) possuem somente um dos profagos e Ishi-1 (Japão) não possui profagos (ZHENG et al., 2016).

Além de estarem ligados a transferência horizontal de genes às liberibactérias fitopatogênicas, como no caso das peroxidases (JAIN et al., 2015), os profagos podem ter ligação também com a incapacidade destas bactérias em crescer fora dos hospedeiros. Fleites et al. (2014) constataram através de ensaio de atividade GUS (β -Glucuronidase) em Lcr BT-1, forte atividade do promotor de holina, cuja atividade tóxica às células de *E. coli* foi comprovada pelos autores neste mesmo trabalho, fusionado ao gene repórter *uidA* em pUFR071. Quando a bactéria foi crescida, tanto em meio contendo extratos brutos de insetos quanto em plantas de citros, a atividade

do promotor foi suprimida. Segundo os autores, tais observações levam a acreditar que a ativação/ não ativação do profago em *Las* está diretamente ligada a seus hospedeiros, o que limitaria seu estilo de vida a endosimbionte (FLEITES et al., 2014).

Outros possíveis genes tóxicos foram encontrados na região dos profagos que podem ser responsáveis, neste caso, por interações entre os patógenos do HLB (ZHANG et al., 2011). Notavelmente uma possível colicina Ia é codificada entre os *late genes* de SC1 (SC1_gp060), enquanto que SC2 codifica uma possível proteína de imunidade a colicina Ia cognata (SC2_gp255). Se caso a célula produtora de colicina possui a proteína de imunidade, ou seja, *Las* carregando ambos os profagos SC1 e SC2, esta tem vantagem sobre outras células que não os possuem (ZHANG et al., 2011). Enquanto que SC2 ao infectar células de *Liberibacter* pode lhe conferir vantagem seletiva devido principalmente aos seus genes de conversão lisogênica, SC1 tem a capacidade de ser letal para qualquer cepa que infecte, com exceção daquelas simultaneamente infectadas pelos dois profagos ou previamente infectadas por SC2 (ZHANG et al., 2011).

1.7. Competição bacteriana

Uma grande quantidade de diferentes espécies de micro-organismos está presente nos mais diversos ambientes. Estas espécies de micro-organismos podem coexistir ou então se sobressair frente a outras na competição pelos mesmos recursos utilizando as mais variadas estratégias (HIBBING et al., 2010). Atividades como motilidade, produção de toxinas, e comportamento coordenado se enquadram em tais estratégias e se configuram como diferenciais competitivos (HIBBING et al., 2010).

As bactérias são organismos que possuem alta interação intra e interespecíes, sendo que, ao mesmo tempo, respondem à estímulos externos do ambiente (STUBBENDIECK; VARGAS-BAUTISTA, 2016a). Algumas estão tão intimamente associadas a outras que possuem uma relação de dependência para a sobrevivência. No entanto, dependendo da densidade na qual se encontram e da escassez de recursos, a sobrevivência de uma célula ou espécie, pode ser a morte de outra, levando a competições por recursos limitados (GHOUL; MITRI, 2016). A integração de profagos ao genoma das bactérias, cuja expressão de genes resulta na conversão

lisogênica, é também uma ferramenta competitiva utilizada por muitas bactérias (JOO et al., 2006).

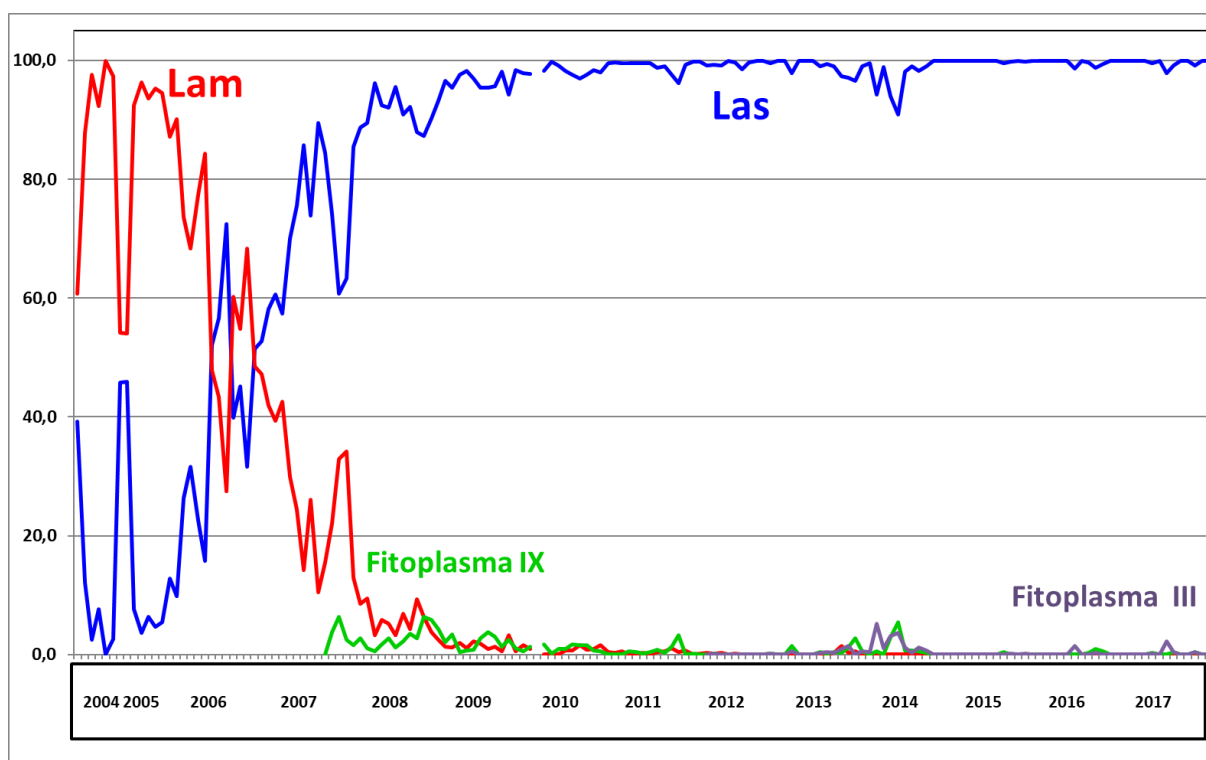
A situação de competição pode ocorrer de duas maneiras, tanto indiretamente, pela competição exploratória, quanto diretamente, pela competição de interferência (GHOUL; MITRI, 2016). A competição exploratória ocorre quando um organismo consome um recurso limitado, através tanto de aumento da captação quanto de secreção extracelular de moléculas que sequestram nutrientes, restringindo o consumo do competidor (STUBBENDIECK; STRAIGHT, 2016b). Ainda mais, outras estratégias podem incluir a produção de enzimas digestivas que degradam moléculas nutrientes complexas ou de moléculas do tipo *íron-scavenging*, que são capazes de acessar o ferro insolúvel (GHOUL; MITRI, 2016). Existem também espécies que competem por uma boa localização dentro de um nicho, impedindo que outros micro-organismos tenham acesso a ele (KIM et al., 2014). Tal fato pode ocorrer tanto pela rápida colonização de lugares inabitados, quanto pela sobreposição a micro-organismos já estabelecidos (GHOUL; MITRI, 2016).

A competição de interferência por outro lado, se caracteriza pela produção de antimicrobianos, que podem variar de bacteriocinas estirpe-específicas, até peptídeos e antibióticos de amplo alcance (CHAO; LEVIN, 1981). Outros mecanismos podem envolver o sistema de secreção Tipo IV (SSTIV), no qual bactérias produzem e injetam toxinas e outras moléculas diretamente nas células vizinhas, que consequentemente lisam e podem ter seu DNA transferido para bactéria produtora como possibilidade de melhora genética (BASLER; HO; MAKALANOS, 2013). Souza et al. (2015) mostraram a importância do SSTIV no comportamento competitivo de *Xanthomonas citri*, direcionando toxinas a células bacterianas vizinhas e conferindo assim vantagem adaptativa em um ambiente ocupado por um número grande de bactérias de diferentes espécies. Desta mesma forma, entre os dois patógenos do HLB no Brasil, pode estar havendo algum tipo de competição, onde a diminuição progressiva de Lam, pode ser consequência, dentre outras, pela vantagem adaptativa conferida a Las pela presença do profagos.

1.7.1. Ocorrência simultânea de Lam e Las.

Lam esteve presente em mais de 77,2% das amostras coletadas e analisadas no Brasil, enquanto que Las esteve presente em apenas 21,4% (WULFF et al., 2006). No ano de 2006 notou-se uma tendência de inversão na ocorrência dos patógenos (Figura 4). Em 2009, apenas 4% das amostras foram positivas para Lam, isto é, houve um aumento significativo de amostras positivas para Las (TEIXEIRA et al., 2010). Esta mudança indica a predominância de Las em detrimento da população de Lam (Figura 4).

Figura 4. Proporção de amostras enviadas por produtores, que foram positivas para Las, Lam, e para o Fitoplasma do grupo IX (87,5 mil amostras entre os anos de 2004 e 2017).



Fonte: Nelson A. Wulff, Fundecitrus (2018)

Experimentos desenvolvidos por Lopes et al. (2009a e b) mostraram que possivelmente a diferença na ocorrência dos dois patógenos no campo está diretamente relacionada a habilidade destas duas bactérias em se multiplicar a diferentes taxas em citros, onde Las atinge título bacteriano dez vezes maior quando comparada a Lam, fazendo com que, consequentemente, a chance de aquisição e

transmissão de Las pelo inseto vetor psílídeo seja maior. A sensibilidade a altas temperaturas é outra diferença, onde Las se mostrou mais resistente a temperaturas até 38°C, enquanto que nas plantas infectadas por Lam, notou-se remissão de sintomas (LOPES et al., 2009a).

Adicionalmente, pode estar ocorrendo competição direta entre Las e Lam. A hipótese é que a presença e a expressão de bacteriocinas, como a colicina Ia, em fagos presentes em Las esteja favorecendo a predominância de Las sobre Lam através de um efeito direto da colicina de Las sobre as células de Lam: as células de Lam seriam sensíveis a colicina Ia de Las e nos casos de co-infecção na planta ou no inseto vetor, resultam em morte das células de Lam, reduzindo a disseminação desta espécie. No genoma de Lam também foi anotada uma proteína com similaridade a ORF SC1_gp060, lam_678, porém esta espécie não tem a proteína de imunidade a colicina no profago, assim como não tem um sistema de secreção do tipo I completo (WULFF et al., 2014). Portanto não é esperado que as células de Lam produzam e secretem colicinas, com possível desvantagem adaptativa em relação a Las. Se confirmadas as funções putativas das colicinas, estas podem se configurar como alvos para utilização em estratégias biotecnológicas no combate aos patógenos. Adicionalmente, uma lisozima relacionada ao profago presente na região cromossomal de Las, também se apresenta como um possível gene alvo.

1.8. Colicinas

Colicinas são bacteriocinas, codificadas por plasmídeos ou profagos, produzidas por alguns tipos de bactérias durante a resposta SOS em condições de stress nutricional ou ambiental como forma de reduzir competição de cepas relacionadas (KLEANTHOUS et al., 1999). O grupo de plasmídeos Col de *E. coli* que produz colicinas, também é capaz de produzir uma proteína de imunidade para a colicina em particular produzida (MANKOVICH; HSU; KONISKY, 1986). A proteína de imunidade, através de interação direta com sua colicina cognata, inibe sua atividade prevenindo a morte da célula produtora, sendo a região C-terminal responsável por essa interação (MANKOVICH; HSU; KONISKY, 1986).

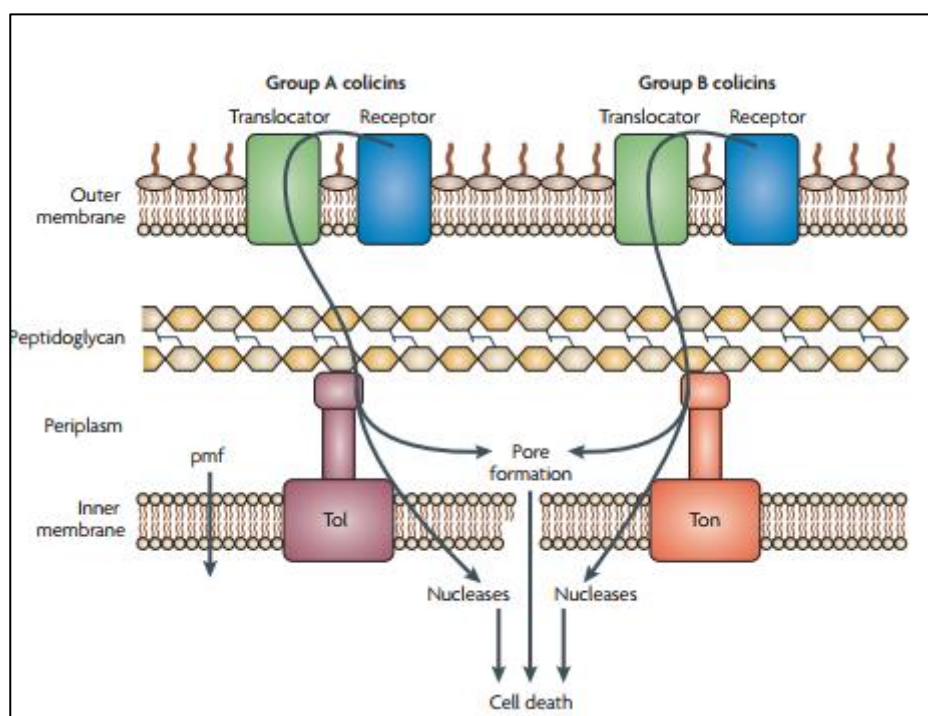
As colicinas possuem três domínios proteicos funcionais que agem em conjunto para se ligar à parte externa da célula alvo, atravessar a membrana externa e se

transportar para um sítio ativo citotóxico (KIENKER et al., 1997; KIM et al., 2014;). Enquanto que domínio N-terminal é responsável pela translocação através da membrana da célula alvo, o domínio central reconhece as células alvo através de receptores específicos na superfície celular, e o domínio C-terminal é responsável pela atividade citotóxica (NARDI; CORDA; DUCHÉ, 2001).

De forma geral elas podem ser divididas em duas classes citotóxicas: colicinas formadoras de poros na membrana interna (E1, A, B, N, Ia e Ib) e colicinas com atividade nuclease (E2, E3 e E9), e entram na célula alvo através de receptores na membrana externa (Figura 5), cujo propósito fisiológico geralmente é o transporte de metabólitos como metais ou vitaminas (CRAMER et al., 1995; WIENER et al., 1997; KLEANTHOUS et al., 1999). Colicinas importadas pelos dois sistemas geralmente são letais para a célula receptora, seja por despolarização da membrana interna ou pela clivagem de ácidos nucleicos no citoplasma (KLEANTHOUS, 2010).

A classificação em grupo das colicinas foi definida com base nas proteínas usadas em sua captação e translocação, sendo A (E1, E3, A, N, E9) para sistema Tol ou B (Ia, Ib, B, D, 5) para sistema Ton (CRAMER et al., 1995).

Figura 5. Via de translocação das colicinas. Todas as colicinas requerem um receptor na superfície da membrana externa e um translocador. Pmf: força próton motora



Diversos patógenos de plantas de importância econômica, produzem bacteriocinas do tipo colicina, assim como *Agrobacterium* e *Brenneria* spp (PARRET; DEMOT, 2002; VIDAVER et al., 1972), no entanto apesar de possuírem alta homologia com as colicinas de *E. coli*, as bacteriocinas do tipo colicina são geralmente maiores, com tamanhos variando de 30 -100 kDa, e pouco se sabe sobre os receptores e mecanismos de entrada das mesmas (GRINTER; MILNER; WALKER, 2012)

Por conta de sua ação letal contra bactérias, as colicinas e as bacteriocinas do tipo colicinas, têm sido amplamente estudadas com enfoque no seu potencial para utilização em tratamento de doenças não só em animais, mas também em plantas (CHAVAN; RILEY, 2007; GRINTER; MILNER; WALKER, 2012; SCHULZ et al., 2015).

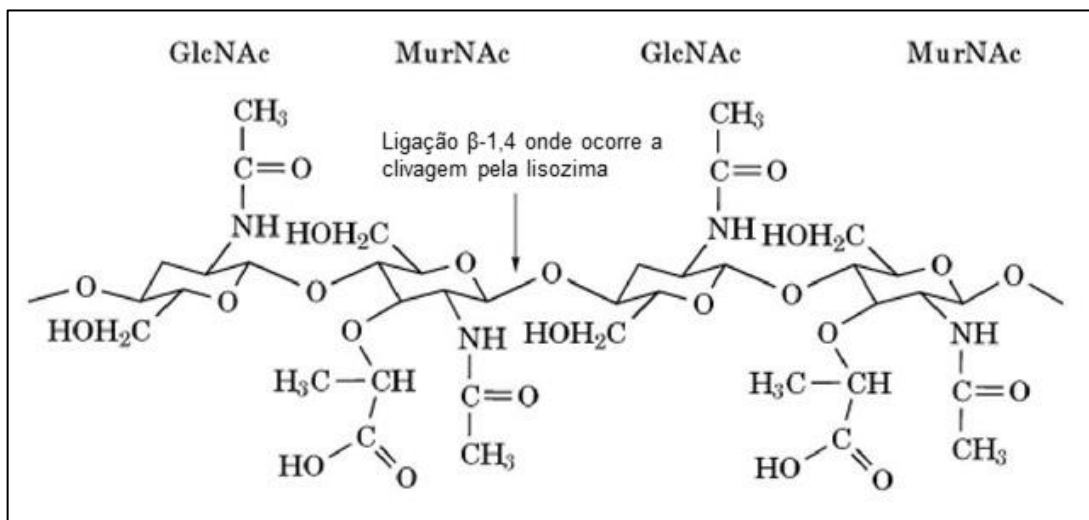
1.9. Lisozimas

Lisozimas são enzimas capazes de lisar células de diversas espécies de microrganismos, e que estão presentes em vários tecidos e secreções (FLEMING, 1922; SALTON, 1958). Desde sua descoberta, milhares de artigos foram publicados acerca de lisozimas presentes em plantas, animais e também em bacteriófagos (CHAPELLE et al., 2009).

De acordo com a origem, as lisozimas são classificadas em 4 grupos distintos: lisozima da clara de ovo de galinha (do tipo c), da clara de ovo de ganso (do tipo g), do tipo bacteriofágica e do tipo bacteriana (JOLLÈS; JOLLÈS, 1984), sendo que os primeiros estudos realizados para determinação de função e características físico-químicas foram feitos a partir da lisozima da clara de ovo, do tipo c, por conter as maiores quantidades da enzima (FLEMING, 1922; ALDERTON; WARD; FEVOLD, 1945).

O mecanismo de ação da lisozima envolve a clivagem das ligações β -1,4 entre os ácidos N-acetilmurâmico (Mur-NAc) e N-acetilglicosamina (Glc-NAc) do peptidoglicano, presente na parede celular de bactérias (Figura 6), resultando em lise das mesmas (FASTREZS, 1996; CHAPELLE et al., 2009).

Figura 6. Mecanismo de ação da lisozima sobre o peptidoglicano presente na parede celular de bactérias.



Fonte: modificado de <http://what-when-how.com/molecular-biology/lysozymes-molecular-biology/>

As lisozimas bacteriofágicas ou relacionadas ao fago, de interesse neste trabalho, possuem um papel fundamental no ciclo lítico dos vírus que infectam bactérias: elas são essenciais no momento da liberação dos vírions ao meio extracelular através da lise do peptidoglicano bacteriano (POTEETE; HARDY, 1994), sendo assim utilizadas para o controle de bactérias fitopatogênicas (DÜRING et al., 1993; KO et al., 2002; KIM; SALM; GEIDER, 2004; LEE et al., 2006).

1.10. Caracterização de genes em Las por genômica funcional

A genômica funcional tem como objetivo descrever as funções e as possíveis interações de genes e proteínas fazendo o uso de abordagens genômicas amplas, assim como também abordagens gene a gene da biologia molecular clássica (BUNNIK; LE ROCH, 2012). Nas liberibactérias patogênicas, devido a impossibilidade de cultivo axênico, existe uma certa dificuldade em estudos funcionais, e uma alternativa é a utilização de expressão heteróloga para a caracterização de genes.

Vahling, Duan e Lin (2010) fizeram a primeira caracterização de uma proteína translocase de ATP (*nttA*) em Las, descoberta quando o genoma de Las foi sequenciado por metagenômica (DUAN et al., 2009), através da expressão heteróloga em *E. coli* BL21 Star (DE3). Nos experimentos, os autores mostraram que a bactéria

carregando o plasmídeo contendo *nttA* captou cerca de 3 vezes mais ATP do meio em relação à bactéria com o plasmídeo vazio. Os autores também chamam a atenção para a característica da *E. coli* que além de usar os mesmos padrões de códon que Las, reconheceu a sequência líder e processou a proteína adequadamente na membrana bacteriana externa, servindo como um intermediário adequado para estudos funcionais heterólogos de proteínas de Liberibactérias (VAHLING; DUAN; LIN, 2010).

Em outros trabalhos em Liberibactérias, foram caracterizados genes na região profágica e cromossomal da bactéria, como holinas, endolisinas, peroxidases e peroxirredoxinas, também com a utilização de expressão heteróloga em *E. coli* BL21(DE3), além de Lcr BT-1, a bactéria cultivável mais próxima filogeneticamente de Las, Lam e Laf (FLEITES et al., 2014, JAIN et al., 2015; JAIN et al., 2018).

Para a caracterização funcional de outros genes de *Liberibacter* spp., como a putativa colicina Ia de Las e Lam e lisozima de Las, se justifica a utilização de sistemas heterólogos para expressão de proteínas como a *E. coli* BL21 (DE3) e Lcr BT-1.

2. OBJETIVOS

I. Geral

Realizar estudos funcionais através da expressão heteróloga das proteínas codificadas pelas ORFs SC1_gp60 e lam_678, possíveis colicinas Ia de Las e Lam, e CLIBASIA_04705 e ED07_RS04705 possíveis lisozimas de Las, possivelmente envolvidos na infecção por bacteriófagos e na competição bacteriana entre Las e Lam.

II. Específicos

- a) Identificar e selecionar ORFs relacionadas a colicina e lisozima nos genomas das liberibactérias disponíveis no NCBI;
- b) Desenhar *primers* específicos para a amplificação das ORFs selecionadas, com adição de sítios de restrição, sequência de Shine-Delgarno e uma His-tag;
- c) Amplificar ORFs selecionadas através de polimerase de alta fidelidade, a partir de isolados de Las e Lam em Laranja Doce e Vinca;
- d) Clonar as ORFs selecionadas em vetor de entrada pGEM®-T Easy e posteriormente em vetores de expressão pET28a e pUFR071 para estudo de expressão heteróloga em *E coli* BL21 (DE3) e Lcr BT-1;
- e) Sequenciar, realizar análises de bioinformática e alinhamento múltiplo das sequências obtidas.
- f) Avaliar a taxa de crescimento das bactérias *E. coli* BL21(DE3) e Lcr BT1 carregando plasmídeos contendo as ORFs selecionadas, através de indução com IPTG em meio de cultura.
- g) Realizar análise de SDS-PAGE e Western-blot para a identificação das proteínas recombinantes expressas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Pesquisa & Diagnóstico e Pesquisa & Biotecnologia Vegetal do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) localizado em Araraquara-SP.

3.1. Microrganismos e vetores de clonagem

No presente trabalho utilizou-se as linhagens bacterianas *Escherichia coli* DH5 α , JM109, BL21(DE3) e *L. crescens* BT-1 como hospedeiras para os plasmídeos pGEM®-T easy (Promega Corp., Madison, USA), pET28a (Novagem®) e pUFR071 (JAIN et al., 2015; FLEITES et al., 2014; DE FEYTER; GABRIEL, 1991). As linhagens assim como os vetores, estão descritos detalhadamente nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2. Descrição das linhagens bacterianas utilizadas

Linhagens	Características	Referência
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F</i> ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r</i> _k ⁻ , <i>m</i> _k ⁺) <i>gal</i> ⁻ <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Termo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (<i>r</i> _k ⁻ , <i>m</i> _k ⁺), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F⁻ traD36, proAB, lacI^q ΔM15].</i>	Promega® Corp., Madison, USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F</i> ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r</i> _B <i>m</i> _B) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen®
<i>Liberibacter crescens</i> BT-1	Isolada de “mountain papaya”	Leonard et al., 2012

Fonte: a autora

Todas as linhagens foram mantidas em glicerol 40% e congeladas em freezer à temperatura de - 80°C.

Tabela 3. Descrição dos vetores utilizados

Vetores	Características	Antibiótico	Referência
pGEM®-T Easy	3,0 kpb; Vetor de clonagem, Amp ^R	Ampicilina	Promega® Corp., Madison, USA
pUFR071	9.4 kpb; repW, ColE1, Mob ⁺ , LacZ ⁺ , Par ⁺ , Cm ^R , Gm ^R	Gentamicina/ Cloranfenicol	Jain et al., 2015; Fleites et al., 2014; De Feyter; Gabriel, 1991
pET28a	5,3 kpb; vetor de expressão, T7 promoter, Can ^R	Canamicina	Novagen®
pMD1	<i>Amplicon</i> SC1_gp060 4.091pb proveniente de Las 2PA em pGEM®-T Easy	Ampicilina	Este trabalho
pMD2	<i>Amplicon</i> SC1_gp060 4.094 pb proveniente de Las Poona em pGEM®-T Easy	Ampicilina	Este trabalho
pMD3	<i>Amplicon</i> lam_678 4.043 pb proveniente de Lam São Paulo em pGEM®-T Easy	Ampicilina	Este trabalho
pMD5	<i>Amplicon</i> CLIBASIA_04790 563 pb proveniente de Las 4PA em pGEM®-T Easy	Ampicilina	Este trabalho
pMD7	Fragmento lam_678 4.027 pb proveniente de pMD3 em pUFR071	Gentamicina/ Cloranfenicol	Este trabalho
pMD8	Fragmento SC1_gp060 4.084 pb proveniente de pMD2 (Terminações <i>Bam</i> HI e <i>Sac</i> I) em pUFR071	Gentamicina/ Cloranfenicol	Este trabalho
pMD9	Fragmento SC1_gp060 4.081 pb proveniente de pMD1 (Terminações <i>Bam</i> HI e <i>Sac</i> I) em pUFR071	Gentamicina/ Cloranfenicol	Este trabalho
pMD12	Fragmento CLIBASIA_04790 547 pb proveniente de pMD5 (Terminações <i>Bam</i> HI e <i>Sac</i> I) em pUFR071	Gentamicina/ Cloranfenicol	Este trabalho
pMD13	Fragmento SC1_gp060 4.064 pb proveniente da amplificação de pMD1 (Terminações <i>Bam</i> HI e <i>Nco</i> I) em pET28a	Canamicina	Este trabalho
pMD14	Fragmento lam_678 4.016 pb proveniente da amplificação de pMD3 (Terminações <i>Sac</i> I e <i>Sal</i> I) em pET28a	Canamicina	Este trabalho
pMD15	Fragmento CLIBASIA_04790 542 pb proveniente da amplificação de pMD5 (Terminações <i>Bam</i> HI e <i>Nco</i> I) em pET28a	Canamicina	Este trabalho
pMD16	Fragmento SC1_gp060 4.067 pb proveniente da amplificação de pMD2 (Terminações <i>Bam</i> HI e <i>Nco</i> I) em pET28a	Canamicina	Este trabalho
pMD17	Fragmento ED07_RS0204515 335pb proveniente da amplificação de Las 3PA (Terminações <i>Bam</i> HI e <i>Nco</i> I) em pET28a	Canamicina	Este trabalho
pMD18	Fragmento 819 pb proveniente de S2 (Terminações <i>Bam</i> HI e <i>Sac</i> I) em pUFR071	Canamicina	Este trabalho
pMD19	Fragmento 831 pb proveniente de S2 (Terminações <i>Sal</i> I e <i>Sac</i> I) em pET28a	Canamicina	Este trabalho
pC8	<i>Amplicon</i> SC1_gp060 4.044 pb proveniente de Las 4PA em pBS	Ampicilina	Este trabalho

Fonte: a autora

3.2. Meios de cultura e condições de cultivo

As linhagens de *E. coli* DH5 α , JM109 e BL21(DE3) foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK; FRITSH; MANIATIS, 1989) líquido ou sólido, (Tabela 4) e incubadas à temperatura de 37° C com ou sem agitação à 250 rpm (rotações por minuto) por 15-24 h. *L. crescens* BT-1 foi cultivada em meio BM7 líquido, com agitação de 125 rpm, ou sólido à temperatura de 28° C por 5-12 dias ou até atingir OD₆₀₀ (Densidade ótica 600nm) 0,6 (FAGEN et al., 2014; FLEITES et al., 2014) (Tabela 4).

Tabela 4. Composição dos meios de cultura

Componentes	Meio LB (Sambrook; Fritsh; Maniatis, 1989)	BM7 (Fagen et al., 2014)
Triptona	5,00g/L	-
Extrato de levedura	5,00 g/L	-
NaCl	10,00 g/L	-
Alfa cetogluturato	-	2,00 g/L
Tampão ACES	-	10,00 g/L
KOH	-	3,75 g/L
BSA	-	150,00 ml/L
TMN-FH	-	300,00 ml/L
pH	7,0	6,5

Fonte: a autora

Aos meios de cultura (LB ou MB7) foram adicionados antibióticos, quando necessário, para a seleção de linhagens de acordo com a marca de resistência do vetor de interesse incorporado, sendo gentamicina, cloranfenicol, ampicilina ou canamicina. Para a seleção de colônias de *E. coli* contendo pGEM®-T easy, pMD1, pMD2, pMD3 e pMD5 utilizou-se ampicilina na concentração final de 100 µg/mL; para a seleção de colônias contendo o vetor pET28a, pMD13, pMD14, pMD15, pMD16 e pMD17 utilizou-se canamicina na concentração final de 100 µg/mL e para a seleção de colônias contendo pUFR071, pMD7, pMD8, pMD9 ou pMD12 (Tabela 3) utilizou-se gentamicina e/ou cloranfenicol nas concentrações finais de 3 µg/mL e 20 µg/mL respectivamente (DE FEYTER et al., 1991; FLEITES et al., 2014; JAIN et al., 2015).

Para a solidificação dos meios LB e BM7, adicionou-se respectivamente 1% e 1,5% de ágar bacteriológico. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave

por 20 minutos à 121° C (LB) ou por filtração (BM7), utilizando-se filtro Milipore 0,22 µm. Os antibióticos também foram esterilizados por filtração.

3.3. Métodos de manipulação de DNA

3.3.1. Extração de DNA Genômico e Plasmidial de folhas de vinca e laranja doce infectadas por Las e Lam

Para a amplificação das ORFs de interesse: i) possível colicina Ia de Las (SC1_gp060) e de Lam (Lam_678), e ii) possíveis lisozimas de Las (CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515), foram utilizados DNA de folhas de vinca (*Catharantus roseus*) e de folhas de laranja doce (*Citrus sinensis*) infectados por Las ou Lam (Tabela 5). O DNA foi extraído seguindo o protocolo de Murray e Thompson (1980).

Para a extração de DNA plasmidial e análise de pGEM® T easy, pET28a, pUFR071, pMD1, pMD2, pMD3, pMD5, pMD7, pMD8, pMD9, pMD12, pMD13, pMD14, pMD15, pMD16 e pMD17 (Tabela 3) utilizou-se Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System Protocol ou Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, EUA). O DNA foi quantificado no aparelho espectrofotômetro Nanodrop 1000 Spectrophotometer V3.8 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, EUA).

Tabela 5. Fonte de DNA utilizado nas amplificações de PCR

Amostra	Fonte	Procedência	Hospedeiro
2PA	Las	Estufa 3 Fundecitrus – planta nº11	Laranja doce
3PA	Las	Estufa 3 Fundecitrus – planta nº21	Laranja doce
4PA	Las	Estufa 3 Fundecitrus – planta nº5	Laranja doce
MF02	Lam	Estufa 3 Fundecitrus – Fonte 4	Laranja doce
MF05	Lam	Estufa 3 Fundecitrus – Fonte 12	Laranja doce
MF06	Lam	Estufa 3 Fundecitrus – Fonte 17	Laranja doce
Poona	Las	Índia (Coleção INRA, Bordeaux, França)	Vinca
São Paulo	Lam	São Paulo – Brasil	Vinca
Vinca	Sadio	Índia	Vinca
MD8	Sadio	Estufa 3 Fundecitrus – planta sadia	Laranja doce
Vinca	Sadio	São Paulo – Brasil	Vinca

Fonte: a autora

3.3.2. Seleção de ORFs e Construção de *Primers*

A partir do *GenBank* no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) foram obtidas sequências das ORFs referentes aos genes da possível colicina Ia: SC1_gp060 do genoma da estirpe Las UF506, na região do profago SC1; Lam_678 do genoma da estirpe Lam São Paulo, e das possíveis lisozimas: CLIBASIA_04790 do genoma da estirpe Las psy62 e ED07_RS0204515 do genoma da estirpe Las HHCA. As sequências foram alinhadas com auxílio do ClustaOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e o desenho de *primers* foi feito com o auxílio da ferramenta SnapGene®.

Para as clonagens direcionadas das ORFs SC1_gp060, lam_678 e CLIBASIA_04790 em pUFR071, aos pares de *primers* MFSD1, MFSD2 e MFSD7, foram adicionados sítios de restrição para *SacI* (*primer forward*) e *BamHI* (*primer reverse*). Assim como feito por JAIN et al (2015), também foi adicionado uma sequência de *Shine-Dalgarno* 7 bases *upstream* ao códon de iniciação aos *primers forward* e uma *His-tag* aos *primers reverse* (Tabela 6). Para a clonagem direcionada

da ORF ED07_RS0204515 em pET28a foi desenhado *primer forward* (MFSD9.f) com sítio de restrição para *NcoI* e *primer reverse* contendo o sítio de restrição para *BamHI* (MFSD9.r). As clonagens direcionadas das ORFs SC1_gp060 e CLIBASIA_04790 em pET28a, foram desenhados *primers forward* (MFSD1-2.f, e MFSD7-2.f respectivamente) com sítio de restrição para *NcoI*, sendo que estes foram utilizados com os *primers reverse* contendo o sítio de restrição para *BamHI* (MFSD1.r e MFSD7.r). No caso da ORF lam_678, foram desenhados *primers forward* e *reverse* (MFSD2-2.f e MFSD2-2.r) para clonagem direcionada utilizando *SacI* e *Sall* (Tabela 6).

Tabela 6. Descrição dos Iniciadores utilizados para a amplificação das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515

Iniciador	Sequência 5' – 3'	Sítio de restrição	ORF
MFSD1.f	TAAGAGCTCAGGAGTAGAACATGGGAT TTTGAATTCAAT	<i>SacI</i>	SC1_gp060 colicina Las UF506
MFSD1.r	TATGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTG GTGTCCATGCCTATGCTCAT	<i>BamHI</i>	SC1_gp060 colicina Las UF506
MFSD2.f	TAAGAGCTCAGGAGTAGAACATGGGTTT TTGGTCTTGGGC	<i>SacI</i>	lam_678 colicina Las São Paulo
MFSD2.r	TATGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTG GTGATTCTCTATTTGCATAT	<i>BamHI</i>	lam_678 colicina Las São Paulo
MFSD7.f	TAAGAGCTCAGGAGTAGAACATGTGTAT TATAACAGAAT	<i>SacI</i>	CLIBASIA_04790 lisozima Las psy62
MFSD7.r	TATGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTG GTGACTTTCTAACAATAACT	<i>BamHI</i>	CLIBASIA_04790 lisozima Las psy62
MFSD1-2.f	GGCGGAAGGCCCATGGGATTTTGAAT TCAATTACATCGATTGCG	<i>NcoI</i>	SC1_gp060 colicina Las UF506
MFSD2-2.f	GCTAATGCGAGCTCATGGGTTTTTGGTC TTGGGCTG	<i>SacI</i>	lam_678 colicina Las São Paulo
MFSD2-2.r	TATCGTGTCGACTCAGTGGTGGTGGTG GTGGTGATTCTCTATTTGCATAT	<i>Sall</i>	lam_678 colicina Las São Paulo
MFSD7-2.f	GACAAGGTAGCCATGGAAATGTGTATTA TAAACAGAATAATATCAT	<i>NcoI</i>	CLIBASIA_04790, lisozima Las psy62
MFSD9.f	GACAAGGTAGCCATGGAAATGACGATT ACAGAAAAAGAAGCAGAAG	<i>NcoI</i>	ED07_RS0204515 lisozima Las HHCA
MFSD9.r	TATGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTG GTGACTTTCTAACAATAAC	<i>BamHI</i>	ED07_RS0204515 lisozima Las HHCA

Shine-Dalgarno: AGGA; *His-tag*: GTGGTGGTGGTGGTGGTG; sublinhado: enzimas de restrição.

Fonte: a autora

3.3.3. Amplificação das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515

Para a amplificação das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 a partir das amostras de DNA descritas na Tabela 5, previamente confirmadas com infecção para Las ou Lam (LI; HARTUNG; LEVY, 2006), utilizou-se PCR com os respectivos *primers*, previamente validados, mostrados na Tabela 6 em termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient ou Veriti™ 96-Well Thermal Cycler. As enzimas utilizadas para a amplificação foram: Phusion® High-Fidelity DNA Polimerase (Thermo Fischer Scientific) ou Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.), esta última para o Nested PCR. A amplificação foi realizada nas seguintes condições, para um volume final de 40µl:

Água livre de nuclease (MilliQ®)	25,8 µl
Tampão Phusion® High-Fidelity DNA Polimerase (5X)	8,0 µl
dNTP (10 mM)	0,8 µl
Iniciador <i>forward</i> (10 µM)	2,0 µl
Iniciador <i>reverse</i> (10 µM)	2,0 µl
DNA genômico ou plasmidial (100 ng/µl)	1,0 µl
Phusion® High-Fidelity DNA Polimerase (2 u/µl) ou Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (2 u/µl)	0,4 µl

As amplificações foram realizadas após a desnaturação inicial de 98° C por 1 minuto, seguida de 39 ciclos subsequentes de desnaturação a 98° C por 15 segundos, anelamento (61°C para MFSD1.f/ MFSD1.r, 54°C para MFSD2.f/ MFSD2.r, 60°C para MFSD7.f/ MFSD7.r, MFSD1-2.f/ MFSD1.r, MFSD2-2.f/ MFSD2-2.r e MFSD7-2.f/ MFSD7.r e 62°C para MFSD9.f/ MFSD9.r) por 30 segundos e extensão a 72° C por 90 segundos, seguidos por uma fase de extensão final a 72° C por 5 minutos.

No caso da ORF lam_678, como não pfoi possível a obtenção do amplicon diretamente por PCR, utilizou-se Nested PCR. Assim, antes da amplificação com os *primers* MFSD2.f/ MFSD2.r, o DNA de vinca infectado por Lam foi amplificado utilizando-se os *primers* lam_SC1_gp60F1 (GTCAGGATGCCTATTTAATCCCGAAGA) e lam_SC1_gp60R1 (CAAATACCCTCTTTCCTCGCTTGCTCTT) (este trabalho), após a desnaturação inicial de 98° C por 30 segundos, seguida de 39 ciclos subsequentes de desnaturação a 98° C por 15 segundos, anelamento à 64° C por 30 segundos, e extensão a 72° C a

1 minuto e 30 segundos, seguidos por uma fase de extensão final a 72° C por 5 minutos. O produto foi diluído 1:200 antes da PCR.

Os *amplicons* foram analisados quanto ao tamanho e perfil de amplificação em eletroforese em gel de agarose, purificados utilizando-se kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, USA) conforme instruções do fabricante e quantificados no aparelho espectrofotômetro Nanodrop 1000 Spectrophotometer V3.8 (Thermo Fischer Scientific, Wilmington, EUA).

3.4. Clonagens

3.4.1. Clonagem em vetor pGEM® -T Easy

Os produtos de PCR dos genes SC1_gp060, lam_678 e CLIBASIA_04790 obtidos a partir de DNA vegetal (Tabela 5) e purificados anteriormente, foram adenilados utilizando-se enzima Taq® DNA Polimerase (Invitrogen). Os produtos de PCR adenilados foram então ligados ao vetor pGEM®-T Easy utilizando-se o kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, EUA), e então utilizados para transformação em DH5 α ou JM109 por eletroporação (SAMBROOK; FRITSH; MANIATIS, 1989). As reações de adelição e ligação foram realizadas de acordo com protocolo do fabricante.

A seleção dos clones foi feita em placas de petri pela adição de IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo) e X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo), nas concentrações finais de 20 mM e 80 ug/mL respectivamente, ao meio LB sólido com ampicilina.

As colônias brancas, selecionadas através de *blue/white screening*, foram repicadas em meio LB líquido com adição de ampicilina e crescidas *overnight* em estufa 37° C sob agitação constante de 250 rpm. Os plasmídeos obtidos da extração de DNA foram digeridos com as enzimas de restrição *Pst*I, *Eco*RI, *Sac*I, *Bam*HI ou *Sa*I e analisados por eletroforese em gel de agarose para confirmação das construções de interesse (Tabela 3).

3.4.2. Subclonagem em vetor replicativo pUFR071

Para a subclonagem no vetor replicativo pUFR071 (Apêndice A), cujo promotor é o *LacZ*, a partir dos insertos obtidos anteriormente em pGEM® - T easy, utilizou-se as enzimas de restrição com extremidades coesivas *SacI* e *BamHI* (Thermo Fischer Scientific). Para a linearização do vetor replicativo e separação dos insertos (*amplicons* SC1_gp060, lam_678 e CLIBASIA_04790) do vetor pGEM® - T easy, o DNA plasmidial das construções pMD1, pMD2, pMD3 e pMD5 (Tabela 3) foi digerido conforme indicação do fabricante. As digestões foram deixadas em estufa à 37° C num período de 15 h e verificadas por eletroforese em gel de agarose. As bandas de interesse referentes ao vetor linearizado e insertos separados do vetor de clonagem foram então recuperados com um fragmento do gel e o DNA foi purificado e quantificado. O DNA dos vetores e insertos foram ligados utilizando-se uma T4 DNA ligase (Promega Corp., Madison, USA) de acordo com protocolo do fabricante. As reações foram mantidas em câmara fria à 16° C por aproximadamente 15 h e então utilizadas para transformação de *E. coli* JM109 ou DH5 α , por eletroporação (SAMBROOK; FRITSH; MANIATIS, 1989). A seleção dos clones se deu em placas de petri pela adição de IPTG e X-GAL (concentrações de 20 mM e 80 μ g/mL respectivamente) ao meio LB sólido contendo cloranfenicol e gentamicina. Colônias com fenótipo de interesse foram repicadas em meio LB líquido com adição dos respectivos antibióticos e crescidas em estufa sob agitação constante. O DNA plasmidial foi extraído, quantificado e então digerido com as enzimas de restrição *SacI*/ *BamHI* e *SphI*. Os perfis de restrição dos plasmídeos foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Clones contendo insertos de tamanho esperado foram sequenciados pela técnica de Sanger na Macrogen (Coréia do Sul). As sequências obtidas foram analisadas com o *software* CodonCodeAligner (CodonCode Corporation, version 8.0.1).

3.4.3. Clonagem em vetor de expressão pET28a

A estratégia utilizada para a clonagem dirigida no vetor de expressão pET28a (Apêndice B), cujo promotor é o T7, foi a partir da amplificação via PCR dos insertos previamente obtidos em pGEM®- T Easy (pMD1, pMD2, pMD3 e pMD5 – Tabela 3)

no caso das ORFs SC1_gp060, lam_678 e CLIBASIA_04790. No caso da ORF ED07_RS0204515, a amplificação ocorreu diretamente de amostra de DNA vegetal do isolado Las 3PA descrita na Tabela 5. Após a amplificação, os *amplicons* foram purificados e posteriormente digeridos com as enzimas de restrição descritas na Tabela 6 de acordo com instruções do fabricante. Para o *amplicons* SC1_gp060, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 provenientes de pMD1, pMD2, pMD5 e DNA vegetal 3PA foram utilizadas as enzimas *NcoI* e *BamHI*, Já para o *amplicon* lam_678, proveniente de pMD3, foram utilizadas as enzimas *Sall* e *SacI*. Assim como os insertos, o vetor também foi digerido com as enzimas de restrição descritas anteriormente (Tabela 6), de acordo com protocolo do fabricante. As reações de digestão foram deixadas à 37° C durante 15 h e posteriormente foram analisadas quanto ao perfil de digestão por eletroforese em gel de agarose. As bandas de interesse referentes ao vetor e insertos com as extremidades coesivas complementares foram excisadas com uma porção do gel de agarose. Após purificação e quantificação, os DNA dos vetores e insertos foram ligados utilizando-se uma T4 DNA ligase (Promega Corp., Madison, USA) de acordo com protocolo do fabricante. As reações foram mantidas à 16°C por 15 h e então foram utilizadas para transformação de *E. coli* DH5 α , por eletroporação (SAMBROOK; FRITSH; MANIATIS, 1989). A seleção dos clones foi feita em placas de petri com meio LB sólido contendo canamicina.

As colônias foram repicadas em meio LB com adição de canamicina e crescidas *overnight* a 37° C sob agitação constante de 250 rpm. Após extração do DNA plasmidial, estes foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI/NcoI* ou *SacI/Sall*, e *AflIII* ou *PstI* e o perfil da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose.

3.4.4. Clonagem de fragmento do Fitoplasma IX em pUFR071 e pET28a como controle não tóxico

Levando-se em consideração os posteriores experimentos de expressão heteróloga, um fragmento de DNA, correspondentes às ORFs *rpIV* e *rpsC*, (proteínas ribossomais L22 e S3, respectivamente; Acesso Genbank KJ806622) do fitoplasma 16SrIX de citros, foi selecionado para ser utilizado como um controle negativo de efeito

não tóxico dos experimentos. O clone S2 (WULFF et al., 2015) foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI/ *Sac*I (gerando um fragmento de 819 pb) para a estratégia de clonagem em pUFR071, e as enzimas *Sac*I/ *Sal*I (gerando um fragmento de 831pb) para a estratégia de clonagem em pET28a. Todas as etapas de clonagem seguiram como descrito nos itens 3.4.2 e 3.4.3.

3.4.5. Sequenciamento

O DNA plasmidial dos clones confirmados por restrição foram aliquotados e enviados para sequenciamento. A Tabela 7 mostra os *primers* utilizados no sequenciamento das ORFs obtidas.

Tabela 7. Iniciadores utilizados para o sequenciamento interno das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515.

Iniciador	Sequência 5' – 3'	ORF	Origem
M13F	GTAAAACGACGGCCAGT	SC1_gp060 lam_678 CLIBASIA_04790	Universal
M13R	GCGGATAACAATTTACACAGG	SC1_gp060 lam_678 CLIBASIA_04790	Universal
T7promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	SC1_gp060 lam_678 CLIBASIA_04790 ED07_RS0204515	Universal
T7terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	SC1_gp060 lam_678 CLIBASIA_04790 ED07_RS0204515	Universal
SC1_gp60F1	TTGATCAGGATAAAATACCTTC	SC1_gp060	Este trabalho
SC1_gp60_F2	TAGATTTCTAGAATTGGCTCAG	SC1_gp060	Este trabalho
SC1_gp60_F3	TGACTATCACTGGGCGG	SC1_gp060	Este trabalho
SC1_gp60_R1	TATCCATACTGGGAATACAAAC	SC1_gp060	Este trabalho
SC1_gp60_R2	CAAGCCATATGCATTATCTATG	SC1_gp060	Este trabalho
SC1_gp60_R3	CGGAAACGTGTAATCCC	SC1_gp060	Este trabalho
SC1_gp60_R4	ATTATGAATGCGGTAATAACC	SC1_gp060	Este trabalho
Lam_SC1_gp60F2	TCAAAGATCAGACTAAAGATGAA	lam_678	Este trabalho
Lam_SC1_gp60F3	TTCATAGCCCTTAAGAAGGAAGCAG G	lam_678	Este trabalho
Lam_SC1_gp60F4	CCCATAAATTGATAGACAAAATC	lam_678	Este trabalho
Lam_SC1_gp60F5	TAAGGTGACGAATGAAGCTAGAACG G	lam_678	Este trabalho
Lam_SC1_gp60F6	TCAAGCAGATAATCGCTTTTCTTCTAT T	lam_678	Este trabalho
Lam_SC1_gp60R6	GGGCATATTCCAATAAAAAGTTATGA ACTA	lam_678	Este trabalho
Lam_SC1_gp60R5	ATAAAGGCGGGAATGTATAA	lam_678	Este trabalho
Lam_SC1_gp60R4	GGGTCTGGGTAATACTGTTCAAGATT	lam_678	Este trabalho
Lam_SC1_gp60R3	ATCCATACAAGGGATATGAACACAT	lam_678	Este trabalho

Fonte: a autora

As sequências obtidas de cada construção foram analisadas no software CodonCodeAligner (CodonCode Corporation, version 8.0.1). As extremidades com sequências de baixa qualidade foram automaticamente eliminadas, enquanto o restante da sequência foi inspecionado manualmente e organizada em contigs. As sequências individuais foram avaliadas e *cut-off* de 20 foi utilizado para edição e determinação do consenso. A sequência consenso final dos clones teve a identificação dos *primers* empregados na amplificação e sítios de clonagem identificados e foi alinhada com demais sequências similares no mesmo software e utilizada para as análises posteriores.

3.5. Ferramentas de predição

As sequências de aminoácidos referentes às ORFs (ExPASy Translate Tool - <https://web.expasy.org/translate/>) foram analisadas em ferramentas de predição tais como hélices transmembranares (TMHMM - <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), presença e localização de sítios de clivagem e peptídeo sinal (SignalP - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e similaridade e conformação terciária (HHpred - <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/>).

Os resultados obtidos para as sequências obtidas neste trabalho foram comparados com os obtidos para as sequências depositadas no banco de dados do NCBI.

Para os posteriores ensaios proteicos, foi determinado através da sequência de aminoácidos das proteínas recombinantes, o valor em kDa, através do *software* PMWC (Protein Molecular Weight Calculator, disponível em: <https://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>).

3.6. Transformação em *E. coli* BL21 (DE3) e *L. crescens* BT-1

As construções obtidas em pUFR071 foram utilizadas para transformação por eletroporação em *L. crescens* BT-1, enquanto que as construções obtidas em pET28a (Tabela 3) foram utilizadas para transformação em *E. coli* BL21 (DE3). Os vetores vazios também foram incorporados mediante transformação nos respectivos

hospedeiros bacterianos para utilização como controle de vetores vazios. A metodologia utilizada para transformação em *E. coli* BL21 (DE3) seguiu o protocolo descrito por Sambrook (1989), enquanto em *L. crescens* BT-1 seguiu-se o descrito por Jain et al (2015).

A seleção dos clones em *E. coli* BL21 (DE3) foi feita pela adição de canamicina ao meio LB sólido. As colônias que tiveram crescimento nas placas contendo os meios LB sólidos foram repicadas em meio líquido com antibiótico e crescidas em estufa sob agitação constante (37°C e 250 rpm). Foi realizada extração do DNA plasmidial e realizada a análise do perfil de digestão do plasmídeo com as enzimas de restrição *Afl*III e *Pst*I em gel de agarose.

A seleção dos clones de *L. crescens* BT-1 foi feita em placas de petri pela adição de gentamicina ao meio BM7 sólido a 28° C.

3.7. Expressão Heteróloga

3.7.1. Expressão Heteróloga por indução das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515 em *E. coli* BL21 (DE3)

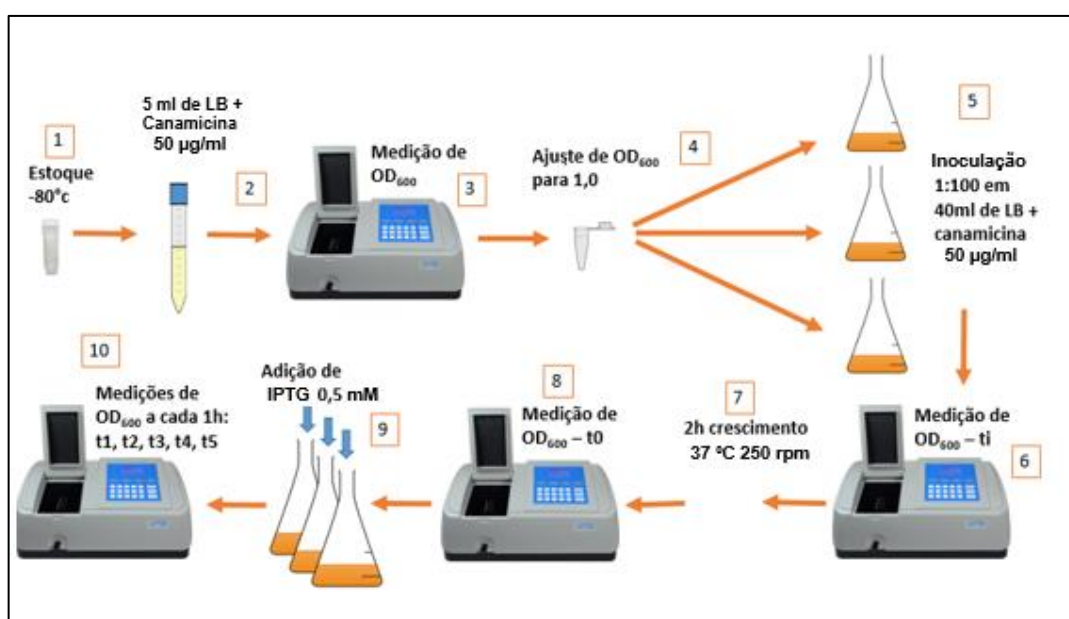
Para analisar funcionalmente o efeito dos genes estudados em *E. coli* BL21 (DE3), experimentos de cinética de crescimento foram realizados. Para tal, foram utilizados: i) BL21(DE3) (sem o vetor pET28a), ii) BL21 (DE3) + pET28a, iii) BL21 (DE3) + pMD19, iv) BL21 (DE3) + pMD13, v) BL21 (DE3) + pMD16, vi) BL21 (DE3) + pMD14, vii) BL21 (DE3) + pMD15 e viii) BL21 (DE3) + pMD17 (Tabela 3).

As colônias de *E. coli* BL21 (DE3) foram cultivados em 5 ml de meio LB contendo canamicina (50 µg/ml) e mantidas à 37° C por um período de 15 h a 250 rpm. Após crescimento, alíquotas das culturas foram retiradas para leitura de OD₆₀₀ em espectrofotômetro. A cultura de *E. coli* BL21 (DE3) sem o vetor pET28a foi crescida em LB e seguiu o mesmo procedimento acima.

Os valores de OD₆₀₀ de todas as culturas foram ajustados para 1,0 e 400 µl foram inoculados em frascos *erlenmeyers* de 250 ml contendo 40 ml de meio LB (proporção 1:100) contendo canamicina (50 µg/ml) (com exceção de BL21(DE3) não transformante). Foram realizados três repiques para cada teste e controle (triplicata biológica). Após a retirada de alíquotas para a medição da OD₆₀₀, as culturas foram

mantidas à 37° C sob agitação de 250 rpm por um período de 2 h. Foram retiradas alíquotas das culturas no período considerado *tempo 0* e, logo em seguida, adicionou-se IPTG na concentração final de 0,5 mM para o início da expressão das ORFs clonadas sob comando do promotor T7 presente em pET28a. Após a indução de IPTG às culturas, foram retiradas as alíquotas para a leitura de OD₆₀₀ em intervalos de 1 h (tempos 1, 2, 3, 4 e 5), totalizando 7 medições de OD₆₀₀ (Figura 7). O experimento foi realizado duas vezes, sendo repetições 1 e 2 (R1 e R2).

Figura 7. Esquema de indução bacteriana com três repetições biológicas.



Fonte: a autora

As culturas foram centrifugadas, o sobrenadante foi separado do precipitado celular (pellet bacteriano) e estes foram armazenados respectivamente em geladeira a 4°C e em freezer a -20° C. O sobrenadante foi utilizado para a precipitação proteica e o pellet bacteriano foi utilizado para obtenção de frações proteica solúvel e insolúvel.

Os precipitados proteicos e as frações solúvel e insolúvel foram analisadas através de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*).

3.8. Precipitação de Proteínas

Com a finalidade de verificar se as proteínas recombinantes pudessem estar no meio de cultura (sobrenadante), foi realizada precipitação das proteínas totais. As culturas de *E. coli* induzidas com IPTG e seus controles foram centrifugadas a 15.000 *g* por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante foi recuperado. Enquanto o pellet seguiu o processo descrito no item 3.9, o sobrenadante foi misturado com 4 volumes de acetona P.A. Os tubos foram levados ao freezer -80° C por uma hora e posteriormente foram centrifugados a 15.000 *g* durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de acetona. O pellet foi seco à 37 °C e ressuspenso em 500 µL de água deionizada MiliQ®.

3.9. Obtenção de frações proteicas solúvel e insolúvel

Com o intuito de verificar em qual porção, solúvel ou insolúvel, as proteínas recombinantes pudessem ser encontradas, foram obtidas ambas as frações solúvel e insolúvel. Os precipitados celulares (pellets) foram lavados com PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM K₂HPO₄, pH 7,4). Centrifugou-se a 7.000 *g* 4°C por 15 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 4 mL de tampão fosfato (20 mM Na₂HPO₄, pH 8,0). Para a ruptura celular e liberação dos corpúsculos de inclusão foram realizados três ciclos de sonicação de 20 segundos, com o mesmo tempo de intervalo em banho de gelo. O tubo contendo o material lisado, foi centrifugado a 15.000 *g* a 4° C por 10 minutos para a precipitação de possíveis corpúsculos de inclusão. O sobrenadante foi armazenado a 4 °C (fração solúvel). O sedimento foi ressuspenso em 4 mL de tampão de solubilização (20 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, 6 M de ureia, pH 8,0) e um novo ciclo de sonicação e centrifugação foi realizado (fração insolúvel) (modificado de PEROTTONI, 2015). Ambas as frações foram aplicadas em SDS-PAGE.

3.10. Western-blotting

Após SDS-PAGE, as frações solúvel e insolúvel das proteínas recombinantes foram submetidas a análise de western-blotting. Para isso, os géis foram equilibrados em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol a 20%) durante 30 minutos e as membranas foram deixadas por 15 segundos em solução de metanol 100% (P.A.), 15 segundos em água deionizada MiliQ® e em seguida 5 minutos em tampão de transferência. A transferência foi realizada através de vácuo por 40 minutos e posteriormente capilaridade *overnight*.

A membrana de nitrocelulose foi retirada cuidadosamente e bloqueada em tampão de bloqueio (leite Molico® (caseína) 10 % (p/v), tampão TBST (TBS 1X, Tween-20 0,05 %) com agitação suave durante uma hora. Em seguida a membrana foi lavada duas vezes com tampão TBST durante 5 minutos e colocada em solução com anticorpo primário anti-His (Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 em tampão TBST durante duas horas. O excesso de anticorpo primário foi removido com lavagem em tampão TBST.

O segundo anticorpo, anti-mouse (Sigma-Aldrich) diluído 1:500 em tampão TBST, foi adicionado à membrana, que permaneceu em agitação suave por duas horas. A membrana foi lavada duas vezes por 5 minutos e colocada em solução reveladora (10 mg de DAB em água deionizada MiliQ®) e bloqueada com solução TBS 1X.

3.11. Análise estatística

Os valores obtidos nas medições de OD₆₀₀ dos experimentos de indução de expressão heteróloga (item 3.7), repetições 1 e 2 (R1 e R2) para colicinas e lisozimas, foram utilizados para o cálculo de variância e posterior comparação de médias através do *software* para análise estatística R (Versão 3.5.0).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ORFs colicina e lisozima

A partir dos genes identificados com possível função de bacteriocina (colicina Ia) SC1_gp060 (Las) (ZHANG et al., 2011), lam_678 (Lam) (WULLF et al., 2014) e lisozima CLIBASIA_04790 (Las) (FLEITES et al., 2014) foram obtidos demais homólogos no NCBI.

4.1.1. Possíveis bacteriocinas em Liberibactérias

As sequências homólogas com identidade à ORF da possível colicina Ia (SC1_gp060) de Las encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Genes e proteínas homólogos de Las e Lam com predição para colicina Ia obtidos a partir do NCBI.

ORF	Tamanho (pb)	Anotação	Tamanho da proteína (aa)	Acesso NCBI	Isolado
SC1_gp060	4.023	Possível colicina Ia	1.340	ADV02637	Las UF506
WSI_05635	4.044	Proteína hipotética	1.347	AGH17484	Las gxpsy
AL011_RS05370	4.044	Proteína hipotética	1.347	KPG62733	Las YCPsy
RH08_RS05415	4.044	Proteína hipotética	1.347	KIH95359	Las FL17
PSGCA5_07	4.044	Similar a colicina Ia	1.347	KRF68325	Las SGCA5
CLIBASIA_05565	4.022	Proteína hipotética	1.246	ACT57679	Las psy62
lam_678	3.858	Proteína hipotética	1.285	NC_022793	Lam São Paulo

Fonte: NCBI

Percebe-se que as ORFs da possível colicina Ia dos isolados SGCA5, gxpsy, YCPsy e FL17 de Las possuem o mesmo tamanho, havendo divergência somente na anotação. A ORF SC1_gp060 de UF506 compartilha anotação com a ORF de SGCA5 (Tabela 8), enquanto que a ORF de psy62 compartilha anotação com a de gxpsy. As sequências das ORFs dos isolados UF506 (ZHANG et al., 2011) e psy62 (DUAN et al., 2009) divergem em tamanho entre si e entre as outras sequências anotadas apresentadas para Las. No caso de Lam, o isolado Lam São Paulo apresenta uma ORF com similaridade para a colicina Ia (WULFF et al., 2014), enquanto o outro genoma de Lam apresenta somente similaridade parcial, provavelmente por ser um *draft* (genoma parcial) (LIN et al., 2013).

A Tabela 9 correlaciona as ORFs quanto a porcentagem de similaridade quando é feito um BLASTn tendo como busca a ORF SC1_gp060 do isolado UF506, anotada por Zhang et al. (2011) como uma possível colicina Ia.

Tabela 9. ORFs similares a SC1_gp060 do isolado Las UF506 (acesso ADV02637) identificadas no NCBI nas bactérias Las e Lam.

ORF/Isolado	Query coverage (%)	E value	Identidade (%)
SC1_gp060/ Las UF506	100	0.0	100
WSI_05635/ Las gxpsy	100	0.0	99
AL011_RS0537/ Las YCPsy	100	0.0	99
RH08_RS05415/ Las FL17	100	0.0	99
PSGCA5_07/ Las SGCA5-1	100	0.0	99
CLIBASIA_05565/ Las psy62	100	0.0	99
lam_678/ Lam São Paulo	7	2e-27	71

Fonte: NCBI

As ORFs de colicina Ia de Las apresentadas na Tabela 9 mostram grande similaridade entre si, apesar das pequenas divergências encontradas no tamanho das ORFs (Tabela 8). No caso da ORF colicina Ia de Lam há uma divergência maior em relação as ORFs de Las. Outros genomas de isolados de *Ca. Liberibacter* spp. depositados nos bancos de dados tem baixa similaridade com esta ORF, semelhante à observada para Lam, como no caso de Lso e Leu (dados não apresentados).

4.1.2. Possíveis lisozimas em Liberibactérias

A Tabela 10 ilustra as ORFs encontradas nos genomas de Las, Lam, Laf e Lcr, com predição para lisozima, ou lisozima relacionada ao fago. Em alguns genomas foram encontradas mais de uma ORF, como acontece para os isolados BT-1 de Lcr e Ishi-1, JXGC e gxpsy de Las. Das treze ORFs encontradas com predição para lisozima ou lisozima relacionada ao fago descritas na Tabela 10 para Las, sete possuem identidade em tamanho (516 bp). As ORFs ED07_RS0204515 e CGUJ_04800 possuem o mesmo tamanho entre si (309 bp), sendo menores que as anteriormente citadas. Outras ORFs possuem tamanho intermediário entre 309 e 516 pb e somente uma das ORFs possui 132 pb. Todas as ORFs possuem anotação para lisozima.

Tabela 10. ORFs de Las, Lam, Laf e Lcr com predição para lisozima.

Gene	Tamanho (pb)	Anotação	Tamanho (aa)	Acesso NCBI	Isolado
CLIBASIA_04790	516	Lisozima relacionada a fago	171	ACT57529	Las psy62
WSI_04625	132	Lisozima relacionada a fago (muraminidase)	43	AGH17293	Las gxpsy
WSI_04630	369	Lisozima relacionada a fago	122	AGH17294	Las gxpsy
WSI_RS04650	516	Lisozima relacionada a fago	171	NC_020549	Las gxpsy
RH08_RS04715	516	Lisozima relacionada a fago	171	NZ_JWHA01000001	Las FL17
AL011_RS04650	516	Lisozima relacionada a fago	171	NZ_LIIM01000002	Las YCPsy
AQ620_RS03095	516	Lisozima relacionada a fago	171	NZ_LMTO01000019	Las SGCA5
ED07_RS0204515	309	Lisozima	102	NZ_JMIL02000200	Las HHCA contig200
B2I23_RS04755	516	Lisozima	171	NZ_CP019958	Las JXGC
B2I23_RS04760	448	Lisozima	151	NZ_CP019958	Las JXGC
CD16_RS04680	516	Lisozima relacionada ao fago	171	NZ_CP010804	Las A4
CGUJ_04790	468	Lisozima relacionada ao fago	155	AP014595	Las Ishi-1
CGUJ_04800	309	Lisozima relacionada ao fago	102	AP014595	Las Ishi-1
B488_05210	483	Lisozima	160	CP003789	Lcr BT-1
B488_07700	492	Possível lisozima de bacteriófago	163	CP003789	Lcr BT-1
B488_08900	693	Lisozima	230	CP003789	Lcr BT-1
G293_RS04805	540	Lisozima	179	NZ_CP004021	Laf PTSAPSY
lam_626	530	Lisozima	171	NC_022793.1	Lam São Paulo

Fonte: NCBI

A Tabela 11, que correlaciona as ORFs quanto à identidade quando é feito um BLASTn tendo como sequência para busca a ORF CLIBASIA_04790, mostra que todas as lisozimas de Las possuem 100% de identidade, enquanto que as ORFs de Lam e Laf diferem um pouco das demais.

Tabela 11. ORFs similares a CLIBASIA_04790 (acesso ACT57529). do isolado Las psy62 identificadas no NCBI nos genomas de Las, Lam e Laf.

ORF	Query cover (%)	E value	Identidade (%)
CLIBASIA_04790/ Las psy62	100	0.0	100
WSI_RS04650/ Las gxpsy	100	0.0	100
WSI_04630/ Las gxpsy	72	3e-118	87
RH08_RS04715/ LasFL17	100	0.0	100
AL011_RS04650/ Las YCPsy	100	0.0	100
AQ620_RS03095/ Las SGCA5	100	0.0	100
ED07_RS0204515/ Las HHCA contig200	100	4e-155	100
B2I23_RS04755/ Las JXGC	100	0.0	100
B2I23_RS04760/ Las JXGC	100	0.0	100
CD16_RS04680/ Las A4	100	0.0	100
CGUJ_04790/ Las Ishi-1	100	0.0	100
CGUJ_04800/ Las Ishi-1	100	0.0	100
G293_RS04805/ Laf PTSAPSY	91	9e-58	71
lam_626/ Lam São Paulo	66	3e-19	68

Fonte: NCBI

As ORFs de Lcr não possuem identidade com as lisozimas de Las, Lam e Laf (Query cover 0%) e, portanto, não estão relacionadas na Tabela 11, mesmo sendo anotadas como lisozimas. A ORF WSI_04625 (Las gxpsy), também não foi relacionada por conta de seu tamanho, que resulta em baixa similaridade.

Na Figura 8 é ilustrada a comparação da sequência da ORF CLIBASIA_04790 com as outras descritas na Tabela 11 para Las, e que possuem tamanhos divergentes. Esta ORF é maior entre suas similares, cuja representatividade, constatada por alinhamento, engloba todas as ORFs de Las listadas com o mesmo tamanho.

Figura 8. Alinhamento dos primeiros 240 nucleotídeos para a ORF lisozima dos isolados de Las do banco de dados do NCBI.



Fonte: a autora.

A discrepância observada entre as ORFs na Figura 8 é devido a predição teórica do códon de iniciação de transcrição. Enquanto em CLIBASIA_04790 o códon iniciador GTG (*start códon 1*, 516 pb) foi utilizado, CGUJ_04790, B2123_RS04760 e WSI_4630 tem códon de iniciação ATG que produz um quadro aberto de leitura menor (*start códons 2, 3 e 4*) de 468, 448 e 369 bp. Nas ORFs ED07_RS0204515 e CGUJ_04800 a predição utilizada emprega o *start códon 5*, gerando uma ORF com 309 pb, também com o códon iniciador ATG. B2123_RS04760 e WSI_4630 possuem uma deleção de 3 pb em relação às outras ORFs.

Para cepas de *E. coli*, tem-se que mais de 80% das ORFs que compõe o genoma possuem ATG como *start códon*, enquanto que menos de 13% apresentam GTG (PANICKER; BROWNING; MARKHAM, 2015), indicando a preferência da bactéria pelo códon iniciador ATG. Não há na literatura dados referentes às liberibactérias, no entanto experimentalmente pode-se obter a informação de qual dos

códons está sendo usado por Las através de um estudo detalhado para determinação da porção N-terminal proteica e também mapeamento da região promotora a partir do mRNA assim como foi feito por Schubert, Kruger e Steinbuchel (1991) para a poli (3-hydroxibutirato) sintase.

A ORF ED07_RS0204515 (menor tamanho da proteína) e a ORF CLIBASIA_04790 (maior tamanho da proteína) foram selecionadas para clonagem em pET28a (vetor para realização de ensaio de expressão heteróloga em *E. coli* BL21(DE3)), assim como as outras ORFs de colicina, e subsequente ensaio de expressão para avaliação de toxicidade em cultura.

4.2. Amplificação das ORFs SC1_gp060, lam_678, CLIBASIA_04790 e ED07_RS0204515

As sequências palindrômicas presentes nos *primers* utilizados nas clonagens, foram escolhidas devido a presença de sítios de restrição para clonagem nos vetores de interesse (pUFR071 e pET28a), ausência na sequência interna das ORFs, e também devido à manutenção do quadro de leitura para uma clonagem direcionada com o sítio de ligação do ribossomo nos vetores.

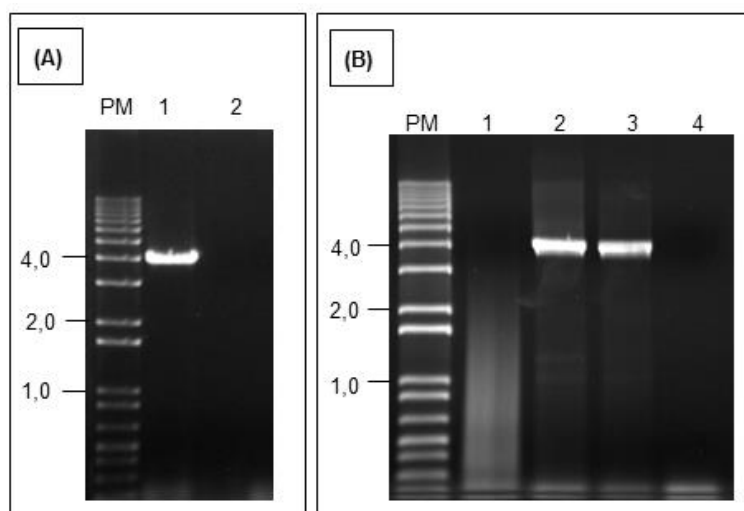
A escolha da Shine-Dalgarno para compor os *primers forward*, e consequentemente os *amplicons* utilizados para a clonagem com extremidades coesiva direcionada em pUFR071, teve como intuito adicionar às construções uma sequência que desempenha um papel importante na formação do complexo de iniciação da tradução por pareamento de base com uma sequência anti-Shine-Dalgarno encontrada na terminação 3' do rRNA (RNA ribossomal) 16S (MA; CAMPBELL; KARLIN, 2002). Na extremidade dos *primers reverse*, a adição de uma cauda de histidina 6x teve como propósito a identificação da proteína recombinante através da análise de *Western-blotting* (JAIN et al., 2015).

A partir do DNA de citros e vinca infectados por Las ou Lam confirmados por PCR (Tabela 5) e utilizando os *primers* construídos (Tabela 6), foram amplificados os fragmentos de DNA correspondentes às ORFs de interesse.

A ORF SC1_gp060, do profago SC1 de Las, foi amplificada a partir de DNA extraído de laranja doce contendo o isolado Las 2PA, e a partir de DNA de vinca contendo o isolado Las Poona da Índia, mantido em casa de vegetação no INRA de

Bordeaux (França). Os *amplicons* possuem 4.091 pb e 4.094 pb respectivamente (Figura 9A e 9B)

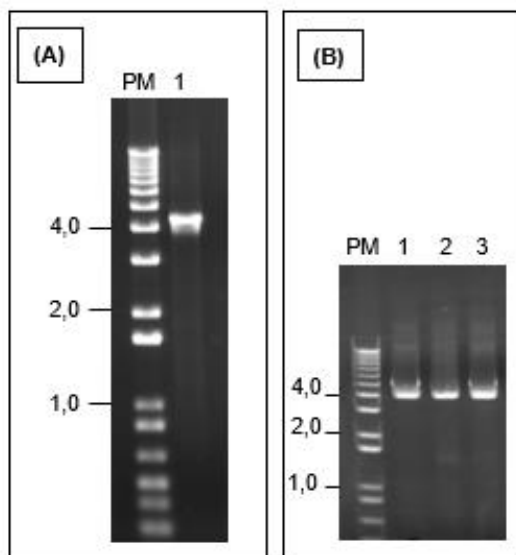
Figura 9. Amplificação da ORF SC1_gp060 e sequencia adjacente com os *primers* *MFSD1.f* e *MFSD1.r* na temperatura de 61°C. **(A)** Perfil eletroforético da amplificação obtida com o isolado Las 2PA de 4.091 pb (canaleta 1) e controle sem DNA, somente reagentes (canaleta 2). **(B)** Perfil eletroforético da amplificação de pMD1 (canaleta 2), isolado Las Poona de 4.094 pb (canaleta 3) e controle sem DNA, somente reagentes (canaleta 4). PM: peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen ®). Canaleta 1 amostra de Las Poona que não amplificou na PCR.



Fonte: a autora

Para a ORF lam_678, foi utilizada a técnica *nested* PCR. O produto da PCR (4.300 pb) com os *primers* lam_SC1_gp60F1 (GTCAGGATGCCTATTTAATCCCGAAGA) e lam_SC1_gp60R1 (CAAAATACCCTCTTTCCTCGCTTGCTCTT) (Figura 10A), foi utilizado como molde na amplificação com os *primers* contendo sítio de restrição *SacI* (MFSD2.f) e *Bam*HI (MFSD2.r). O *amplicon* obtido possui 4.043 pb (Figura 10B).

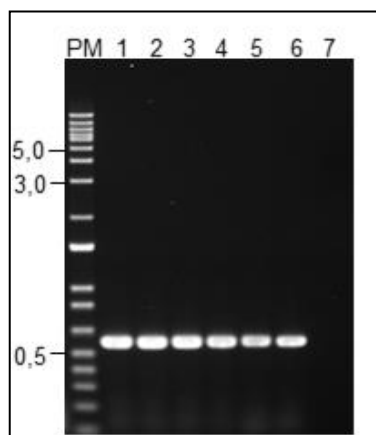
Figura 10. Amplificação da ORF lam_678 por PCR. **(A)** Perfil eletroforético da amplificação com os *primers* lam_SC1_gp60F1 e lam_SC1_gp60R1 na temperatura de 62°C, com o isolado Lam São Paulo 4.300 pb (canaleta 1) **(B)** Perfil eletroforético da amplificação via *nested* PCR com os *primers* MFSD2.f e MFSD2.r do produto de 4.043 pb na temperatura de 54°C do isolado Lam São Paulo (canaletas 1 a 3). PM: peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen ®);



Fonte: a autora

A ORF CLIBASIA_04790 foi amplificada com os *primers* MFSD7.f e MFSD7.r (Tabela 5) a partir de DNA de laranja doce com o isolado Las 4PA. O *amplicon* obtido possui 563 pb (Figura 11).

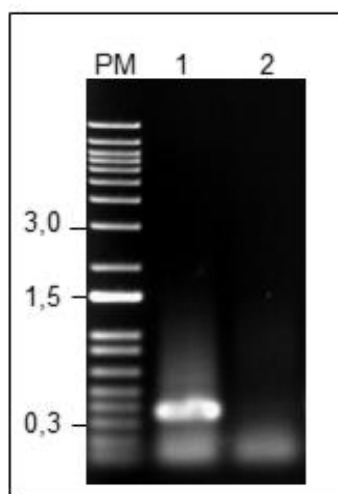
Figura 11. Amplificação da ORF CLIBASIA_04790 com os *primers* MFSD7.f e MFSD7.r na temperatura de 62°C a partir de DNA do isolado 4PA (canaletas 1-6) e controle sem DNA, somente reagentes (canaleta 7). PM: peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen ®). A ORF CLIBASIA_04790 representa a forma longa do gene da lisozima com 563 pb.



Fonte: a autora

O produto da amplificação da ORF ED07_RS0204515 foi obtido a partir de DNA de laranja doce com o isolado de Las 3PA (Tabela 7) utilizando-se os *primers* MFSD9.f e MFSD9.r. O *amplicon* possui 335 pb (Figura 12).

Figura 12. Amplificação da ORF ED07_RS0204515 com os *primers* MFSD9.f e MFSD9.r na temperatura de 62°C a partir de DNA do isolado 3PA (canaleta 1) e controle sem DNA, somente reagentes (canaleta 2), PM: peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen ®). A ORF ED07_RS0204515 de 355 pb representa a forma curta da lisozima.



Fonte: a autora

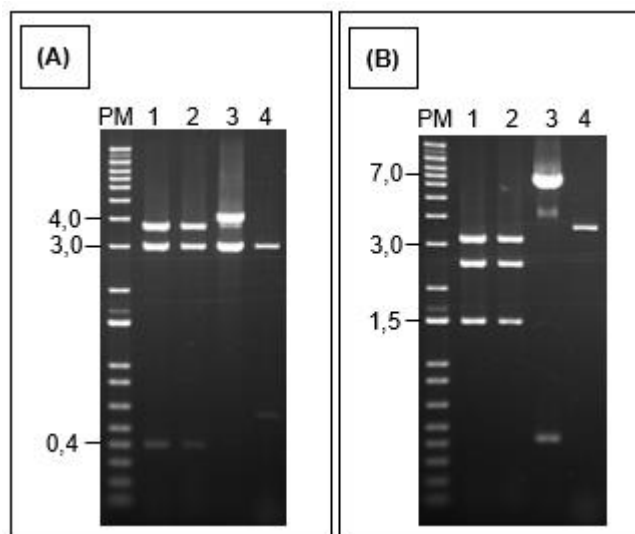
4.3. Clonagem em vetor pGEM® - T Easy

A análise do perfil eletroforético dos fragmentos de DNA originados da digestão com as enzimas *EcoRI* e *PstI* dos plasmídeos obtidos na transformação genética (Figura 13), confirmou a presença dos insertos SC1_gp060 (colicina Ia Las), lam_678 (colicina Ia Lam) e CLIBASIA_04790 (Lisozima Las) em pGEM®-T Easy.

O perfil esperado da digestão com *EcoRI* para a ORF colicina Ia de Las (tanto proveniente do isolado 2PA (pMD1), quanto proveniente de Poona (pMD2)) em pGEM®-T Easy compreende bandas de 3.679 pb, 2.997 pb, 391 pb e 41 pb, sendo esta última não visualizável no gel. A digestão com *PstI* produz fragmentos de DNA de 3.140 pb, 2.489 pb e 1.479 pb. No caso da ORF colicina Ia de Lam em pGEM®-T Easy (proveniente do isolado Lam São Paulo (pMD3)), o perfil da digestão com *EcoRI* gera bandas de 4.063 pb e 2.997 pb e o perfil da digestão com *PstI* fragmentos com

6.650 pb e 410 pb. Para a CLIBASIA_04790 a digestão com *EcoRI* produz bandas de 2.997 pb e 583 pb e a digestão com *PstI* compreende uma única banda de 3.580pb.

Figura 13. Perfil eletroforético de digestão das construções em pGEM®-T easy com as enzimas *EcoRI* (A) e *PstI* (B) dos plasmídios pMD1, com a ORF SC1_gp060 de Las 2PA (canaleta 1), pMD2 com a ORF SC1_gp060 de Las Poona (canaleta 2); pMD3 com a ORF lam_678 de Lam São Paulo (canaleta 3) e pMD5 com ORF CLIBASIA_04790 de Las 4PA (canaleta 4) PM: peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®).



Fonte: a autora

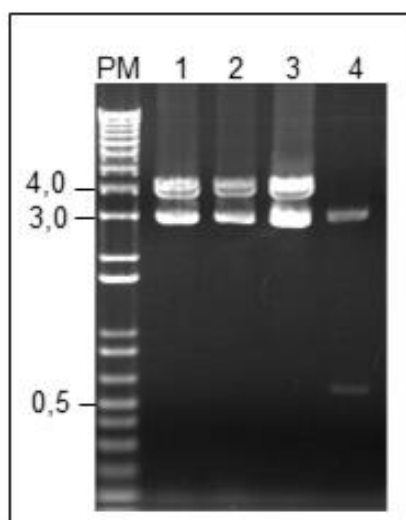
As construções obtidas em *E. coli* DH5α foram confirmadas por digestão com enzimas de restrição e eletroforese em gel de agarose, sendo pMD1 (pGEM®-T Easy com a ORF SC1_gp060 de Las 2PA), pMD2 (pGEM®-T Easy com a ORF SC1_gp060 de Las Poona), pMD3 (pGEM®-T Easy com a ORF lam_678 de Lam São Paulo) e pMD5 (pGEM®-T Easy com a ORF CLIBASIA_04790 de Las 4PA de Lisozima proveniente de citrus com isolado 4PA) (Tabela 3).

4.4. Clonagem por restrição em pUFR071

Para a expressão das ORFs referentes a colicina (Las SC1_gp060 e Lam lam_678) e lisozima (Las CLIBASIA_04790) em *L. crescens* BT-1 foi utilizado o vetor replicativo pUFR071. Este vetor tem a origem de replicação *repW* que é funcional em *L. crescens* (FLEITES et al., 2014). *L. crescens* é a bactéria cultivável mais próxima filogeneticamente das Liberibactérias associadas ao HLB, portanto,

adequada para estudos de genômica funcional neste grupo de bactérias. As ORFs de interesse foram clonadas por enzimas de restrição pela digestão com *Bam*HI/*Sac*I dos plasmídeos pMD1, pMD2, pMD3 e pMD5. O perfil eletroforético das digestões dos plasmídeos com as enzimas *Bam*HI/*Sac*I apresenta três fragmentos, dois condizentes com o tamanho do vetor de clonagem pGEM®-T Easy (2.975 pb e 58 pb, sendo este último não visualizável no gel), e outro condizente com o tamanho dos insertos SC1_gp060, proveniente de 2PA e Poona (4.075 pb e 4.078 pb), lam_678 (4.027 pb) ou CLIBASIA_04790 (547 pb) (Figura 14). O perfil eletroforético da digestão do vetor pUFR071 resulta em uma banda de 9.400 pb, indicando que o mesmo foi linearizado (não mostrado).

Figura 14. Perfil eletroforético de restrição com as enzimas *Bam*HI e *Sac*I do DNA plasmidial das construções em pGEM®-T easy: pMD1 (canaleta 1), pMD2 (canaleta 2), pMD3 (canaleta 3) e pMD5 (canaleta 4). PM: peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®).

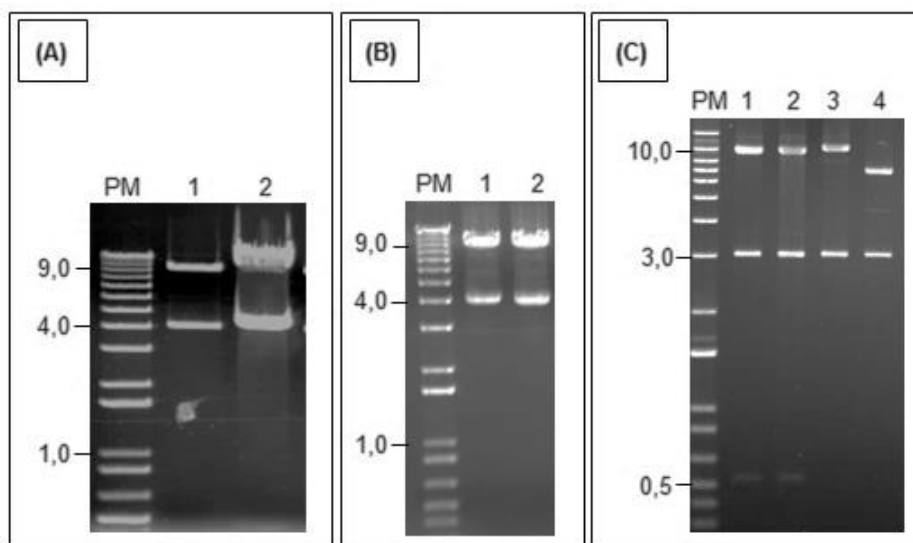


Fonte: a autora

As ORFs das colicinas (Las SC1_gp060 e Lam lam_678) e lisozima (Las CLIBASIA_04790) foram clonadas no plasmídio pUFR071 e transformadas em *E. coli* DH5α por eletroporação. A confirmação da clonagem e orientação foi obtida com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Sac*I e *Sph*I. Foram obtidos os seguintes plasmídios: pMD7 (pUFR071 com ORF lam_678, de Lam São Paulo); pMD8 (pUFR071 com ORF SC1_gp060, de Las Poona); pMD9 (pUFR071 com ORF SC1_gp060, de Las 2PA), e pMD12 (pUFR071 com ORF CLIBASIA_04790 de Las 4PA) (Tabela 3 e Apêndice C).

As Figuras 15A e 15B (perfil de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sac*I) exibem dois fragmentos de DNA para a digestão dos plasmídeos pMD9 (9.424 pb e 4.075 pb), pMD8 (9.424 pb e 4.078 pb) e pMD7 (9.424 pb e 4.027 pb) mostrando claramente o inserto e o vetor; pMD12 apresenta perfil com bandas de 9.424 pb (vetor) e 547pb (inserto) (dado não mostrado). Na Figura 15C (enzima de restrição *Sph*I) pode-se observar os fragmentos de DNA de 10.436 pb e 3.015 pb para o clone pMD7; 9.957pb, 3.015 pb, 530 pb e 526 pb (as duas últimas correspondentes uma única banda no gel) para pMD8; 9.954 pb, 3.015 pb, 530 pb e 526 pb (as duas últimas correspondentes a uma única banda no gel) para pMD9 e 6.956 pb e 3.015 pb referentes ao plasmídeo pMD12.

Figura 15. Perfil eletroforético de plasmídeos após a digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sac*I (A e B) e *Sph*I (C). A. Plasmídeo pMD9 (canaleta 1) e pMD8 (canaleta 2), B. plasmídeo pMD7 (canaletas 1 e 2). C. Plasmídeos pMD9 (canaleta 1), pMD8 (canaleta 2), pMD7 (canaleta 3) e pMD12-1 (canaleta 4). PM: peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen®).



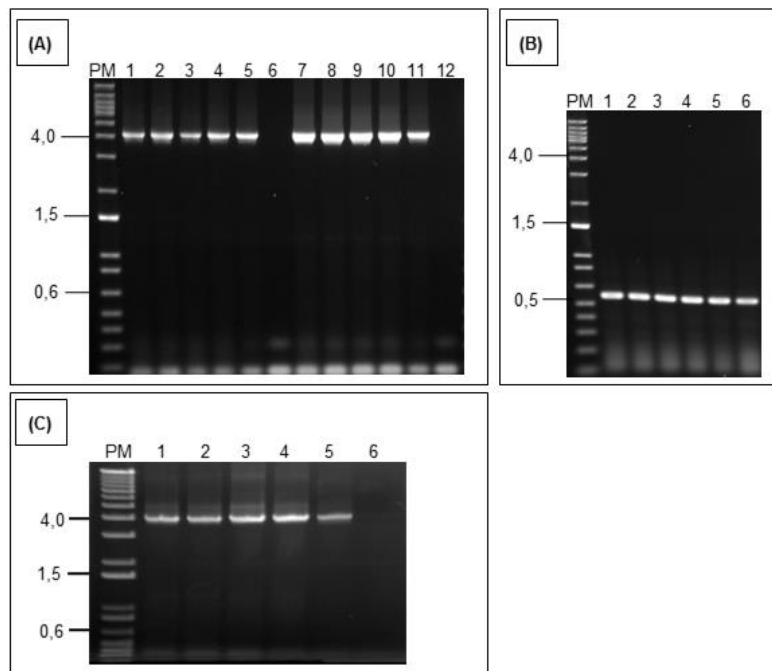
Fonte: a autora

Os perfis de restrição ilustrados na Figura 15 confirmam as clonagens dos genes de interesse em pUFR071. As colônias de *E. coli* foram estocadas em glicerol a - 80 °C.

4.5. Clonagem com enzimas de restrição em pET28a

A clonagem em pET28a, vetor de expressão para utilização em *E. coli* BL21 (DE3), foi obtida pela amplificação das ORFs das bacteriocinas, Las SC1_gp060 em pMD1 e pMD2; lam_678 em pMD3 e lisozima, Las CLIBASIA_04790 em pMD5 (Figuras 16A, 16B e 16C). A lisozima Las ED07_RS0204515, foi amplificada diretamente do DNA do isolado Las 3PA em laranja doce (Tabela 3). Tanto o vetor pET28a quanto os *amplicons* obtidos por PCR foram digeridos com as enzimas *Bam*HI/*Nco*I ou *Sac*I/*Sa*II (Figura 12). Como a digestão foi feita a partir dos *amplicons*, esses não mostraram perfil eletroforético diferente do apresentado nas Figuras 12, 16A, 16B ou 16C. No caso do vetor, este somente mostrou perfil linearizado (não mostrado).

Figura 16. Amplificação da ORF SC1_gp060 de Las e Lam a partir das construções em pGEM®-T easy. **(A)** Amplificação na temperatura de 60°C a partir de pMD1 (canaletas 1 a 4); controle positivo (canaleta 5) e controle sem DNA (canaleta 6), e a partir de pMD3 (canaletas 7 a 10); controle positivo (canaleta 11) e controle sem DNA (canaleta 12). **(B)** Amplificação a 62°C a partir de pMD5 (canaletas 1 a 5); controle positivo (canaleta 6). **(C)** Amplificação a 60°C a partir de pMD2 (canaletas 1 a 4); controle positivo (canaleta 5) e controle sem DNA (canaleta 6); PM: peso molecular 1kb plus DNA ladder (Invitrogen®).

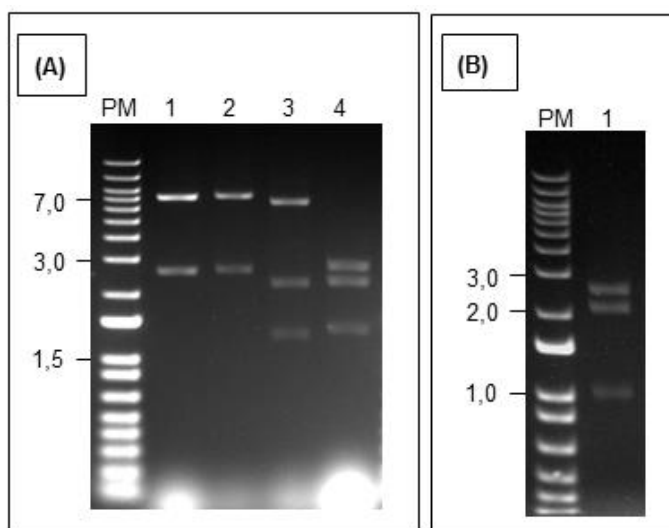


Fonte: a autora

A confirmação da clonagem em pET28a e da orientação do inserto foi realizada pela digestão dos plasmídeos com as enzimas de restrição *Afl*III ou *Pst*I para os plasmídeos pMD13 (pET28a + ORF SC1_gp060 de Las 2PA), pMD14 (pET28a + ORF colicina de Lam São Paulo), pMD15 (pET28a + ORF CLIBASIA_04790, lisozima de Las 4PA), pMD16 (pET28a + ORF SC1_gp060 de Las Poona), e pMD17 (pET28a + ORF ED07_RS0204515, lisozima de Las 3PA (Tabela 3 e Apêndice D).

Na Figura 17A observa-se dois fragmentos de DNA gerados a partir da digestão com a enzima *Afl*III do plasmídeo pMD13 (6.846 pb e 2.489 pb) e pMD16 (6.846 pb e 2.492 pb); três fragmentos de DNA são observados na digestão com *Pst*I do DNA plasmidial de pMD14 (6.099 pb, 2.101 pb e 1.182 pb) e pMD15 (2.491 pb, 2.101 pb e 1.221 pb). Na Figura 17B, observa-se 3 bandas resultantes da digestão com *Afl*III do DNA plasmidial de pMD17 (2.491 pb, 2.101 pb e 1.014 pb).

Figura 17. Perfil eletroforético após digestão com enzimas de restrição das construções em pET28a. **(A)** Digestão com *Afl*III de pMD13 (canaleta 1) e pMD16 (canaleta 2) e digestão com *Pst*I de pMD14 (canaleta 3) e pMD15 (canaleta 4). **(B)** Digestão com *Afl*III de pMD17 (canaleta 1). PM: peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen ®).



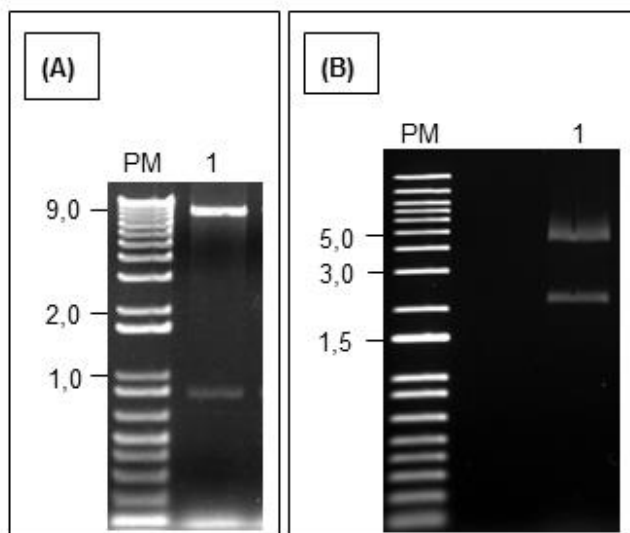
Fonte: a autora

Os perfis de restrição ilustrados na Figura 17 confirmam as clonagens dos genes de interesse em pET28a. As colônias de *E. coli* foram estocadas em glicerol a -80°C .

4.6. Construção de um controle de expressão

Um fragmento de DNA de 819 pb do plasmídeo S2 (vetor pBS contendo as ORFs *rpV* e *rpsC*, cujos produtos são as proteínas ribossomais L22 e S3 respectivamente) foi obtido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sac*I. Este DNA foi clonado em pUFR071 gerando o plasmídeo pMD18. A digestão deste plasmídeo com *Sac*I e *Sal*I gerou um fragmento de DNA de 831 pb que foi clonado em pET28a, plasmídeo denominado pMD19. As Figuras 18A e 18B mostram o perfil eletroforético dos plasmídeos pMD18 (fragmento de 819 pb do clone S2 em pUFR071), digerido com as enzimas *Bam*HI/*Sac*I, e pMD19 (fragmento de 831 pb do clone S2 em pET28a) digerido com a enzima *Afl*III. As bandas de 9.424 pb e 819 pb confirmam a clonagem em pUFR071 e as bandas de 4.096 pb e 2.101 pb confirmam a clonagem em pET28a. Estoques em glicerol à -80 °C dos clones obtidos.

Figura 18. Perfil eletroforético do produto da digestão dos plasmídeos pMD18 com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sac*I (A); e pMD19 com a enzima de restrição *Afl*III (B). PM: peso molecular 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen ®).



Fonte: a autora

4.7. Análise de sequenciamento

Os plasmídeos pMD1 (Las 2PA), pMD2 (Las Poona), pMD3 (Lam São Paulo), pMD5 (Las 4PA), pMD13 (Las 2PA), pMD14 (Lam São Paulo), pMD15 (Las 4PA),

pMD16 (Las Poona) pMD17 (Las 3PA), pMD18 e pMD19 (Clone S2) tiveram seu inserto sequenciado e comparado com a sequência depositada no NCBI. Adicionalmente, os produtos das amplificações por PCR da ORF colicina de Lam provenientes dos isolados MF02, MF05 e MF06 (Tabela 5) também foram sequenciados.

A sequência das ORFs colicinas e lisozimas dos plasmídeos pMD13, pMD16, pMD14 e pMD15 foram comparadas com as sequências respectivas de pMD1, pMD2, pMD3 e pMD5, e com as respectivas sequências das ORFs depositados no NCBI. Da mesma maneira, a sequência de interesse dos clones pMD18 e pMD19 foram comparadas com as do clone S2 e do NCBI. As sequências apresentaram 100% de identidade com suas fontes e foram analisadas em função do objetivo de cada plasmídeo e discutidos na sequência.

O sequenciamento completo dos plasmídeos pMD9, pMD8, pMD7, pMD12, não foi necessário visto que estes foram obtidos através da digestão de pMD1, pMD2, pMD3 e pMD5.

4.7.1. Análise de sequência das colicinas de Las

Quando comparadas as sequências da ORF colicina la de Las disponíveis no banco de dados do NCBI, com as sequências da ORF dos plasmídeos pMD1 (Las 2PA), pMD2 (Las Poona) e de pC8 (Las 4PA) (Tabela 3), percebe-se que há uma inserção de 24 nucleotídeos (GAAGCTCAAGAGAAAGCGAAAAG) na sequência consenso do alinhamento que vai da posição 1585 a 1608 somente na ORF de Las Poona. Esta mesma ORF apresenta uma deleção de 21 nucleotídeos (TAAAAAAGGGAAAGAACCCGG) na posição 1758 a 1779 relativa ao consenso. Outra diferença nas sequências pode ser notada na posição 1731 a 1751 para SC1_gp060 (isolado UF506) e CLIBASIA_05565 (isolado psy62), os quais possuem uma deleção de 21 nucleotídeos (AGAAGCAGAGCCCGCAAAAGA) em relação a mesma sequência para os outros isolados (Figura 19). Estas diferenças podem ser notadas também na Tabela 8. As inserções e deleções (*indels*) não alteram o quadro de leitura ou *frame*, tal como mostra o alinhamento de aminoácidos para as mesmas ORFs (Figura 20). Somente são ilustradas as diferenças observadas entre as sequências, os trechos idênticos foram suprimidos (Figuras 19 e 20).

Figura 19. Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a colicina Ia de isolados de Las. Sequência das ORFs dos isolados Las 2PA (pMD1), Las Poona (pMD2) e Las 4PA (pC8) em comparação com as sequências das ORFs SC1_gp060 (Las UF506 acesso ADV02637), WSI_05635 (Las gxpsy acesso AGH17484), AL011_RS05370 (Las YCPsy acesso KPG62733), RH08_RS05415 (Las FL17 acesso KIH95359), PSGCA5_07 (Las SGCA5 acesso KRF68325) e CLIBASIA_05565 (Las psy62 acesso ACT57679). Traços significam ausência de nucleotídeos; asteriscos (*) significam identidade de 100% no consenso. Os números indicados referem-se à sequência consenso do alinhamento. Gerado por CLUSTAL OMEGA.

Las_Poona	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAGGAAGCTCAAGAGAAAGCGAAAGGAAGCTCAAGAG	
Las_2PA	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAG-----GAAGTACAAGAG	
Las_SGCA5	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAG-----GAAGTACAAGAG	
Las_FL17	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAG-----GAAGTACAAGAG	
Las_4PA	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAG-----GAAGTACAAGAG	
Las_gxpsy	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAG-----GAAGTACAAGAG	
Las_YCPsy	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAG-----GAAGTACAAGAG	
Las_UF506	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAG-----GACCTACAAGAG	
Las_psy62	GCCGACAGAGAGAAAGCGGATAAG-----GACCTACAAGAG	

	1561	1585
Las_Poona	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGTGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	1608
Las_2PA	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGGATGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	
Las_SGCA5	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGGATGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	
Las_FL17	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGGATGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	
Las_4PA	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGGATGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	
Las_gxpsy	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGGATGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	
Las_YCPsy	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGGATGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	
Las_UF506	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGGATGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	
Las_psy62	AAGACACCTATAAAAGCGGAGGGGGATGATTTTGGTTTAGGGCTCCCTCCCGTCCCGACT	

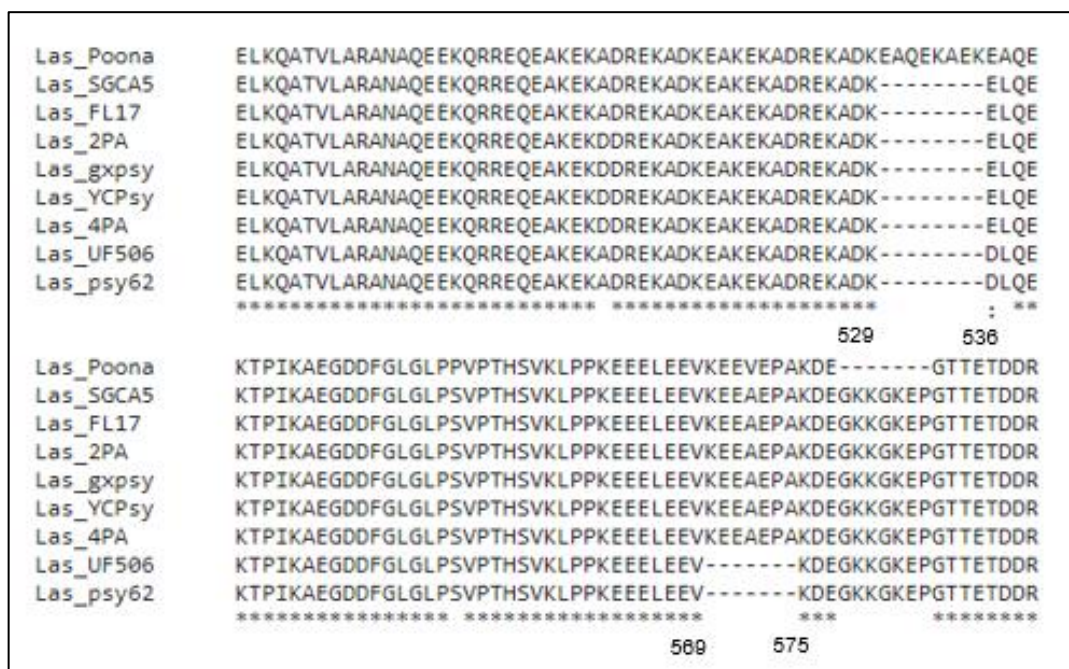
	1621	
Las_Poona	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGAAGAAGTAGAG	
Las_2PA	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGAAGAAGCAGAG	
Las_SGCA5	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGAAGAAGCAGAG	
Las_FL17	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGAAGAAGCAGAG	
Las_4PA	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGAAGAAGCAGAG	
Las_gxpsy	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGAAGAAGCAGAG	
Las_YCPsy	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGAAGAAGCAGAG	
Las_UF506	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGA-----	
Las_psy62	CATTCTGTTAAACTTCCGCCTAAAGAAGAAGAGCTTGAAGAGGTTAAAGA-----	

	1681	1730
Las_Poona	CCCGCAAAGACGAGGG-----TACAACAGAGACGGACGATAGA	
Las_2PA	CCCGCAAAGACGAGGGTAAAAAGGGAAAGAACC CGGTACAACAGAGACGGACGATAGA	
Las_SGCA5	CCCGCAAAGACGAGGGTAAAAAGGGAAAGAACC CGGTACAACAGAGACGGACGATAGA	
Las_FL17	CCCGCAAAGACGAGGGTAAAAAGGGAAAGAACC CGGTACAACAGAGACGGACGATAGA	
Las_4PA	CCCGCAAAGACGAGGGTAAAAAGGGAAAGAACC CGGTACAACAGAGACGGACGATAGA	
Las_gxpsy	CCCGCAAAGACGAGGGTAAAAAGGGAAAGAACC CGGTACAACAGAGACGGACGATAGA	
Las_YCPsy	CCCGCAAAGACGAGGGTAAAAAGGGAAAGAACC CGGTACAACAGAGACGGACGATAGA	
Las_UF506	-----CGAGGGTAAAAAGGGAAAGAACC CGGTACAACAGAGACGGACGATAGA	
Las_psy62	-----CGAGGGTAAAAAGGGAAAGAACC CGGTACAACAGAGACGGACGATAGA	

	1741	1752 1758 1779

Fonte: a autora

Figura 20. Alinhamento das sequências de aminoácidos relativas à ORF da colicina Ia de isolados de Las. Sequência de aminoácidos referentes às ORFs dos isolados de Las 2PA (pMD1) Las Poona (pMD2) e Las 4PA (pC8) em comparação com a sequência de aminoácidos do banco de dados (NCBI) das ORFs SC1_gp060 (Las UF506 acesso ADV02637), WSI_05635 (Las gxpsy acesso AGH17484), AL011_RS05370 (Las YCPsy acesso KPG62733), RH08_RS05415 (Las FL17 acesso KIH95359), PSGCA5_07 (Las SGCA5 acesso KRF68325) e CLIBASIA_05565 (Las psy62 acesso ACT57679). Traços significam ausência de nucleotídeos; asteriscos (*) significam identidade de 100% no consenso. Os números indicados referem-se à sequência consenso do alinhamento. Gerado por CLUSTAL OMEGA.



Fonte: a autora

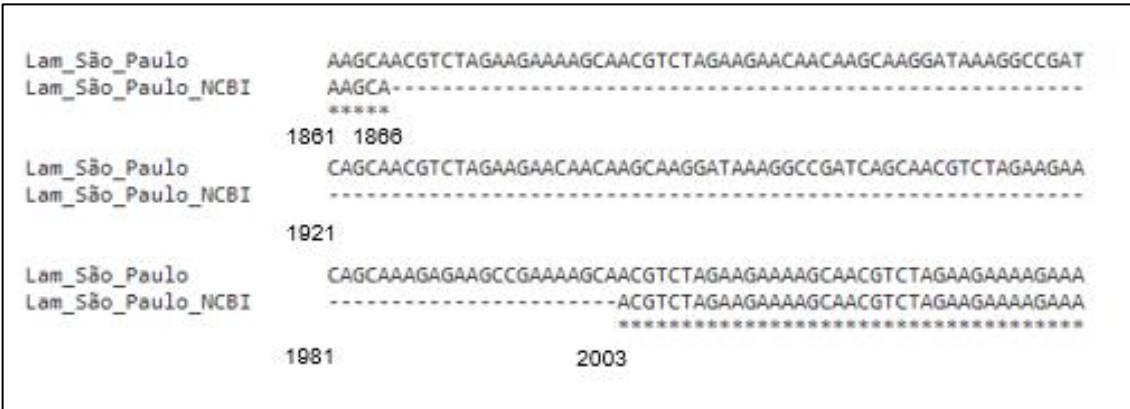
Para as colicinas, fenômenos de mutações, tais como as deleções e inserções encontradas nas sequências analisadas, podem significar uma seleção positiva agindo para aumentar a diversidade natural das colicinas, tornando as espécies mais competitivas (RILEY, 1993). As diferenças entre as sequências das ORFs apontadas nas Figura 19 e 20 (colicina Ia de Las) parecem estar relacionadas a origem do isolado de Las analisado. As amostras de Las dos EUA (FL17, UF506 e psy62) apresentam duas variações exclusivas. A possível correlação entre eventos mutacionais e o hospedeiros de Las pode ser explicada pela maior tendência de replicação e expressão de genes do profago SC1 em vinca (Las Poona) do que quando comparada a citros ou psilídeos (ZHANG et al., 2011), o que poderia levar ao acúmulo de mutações no genoma. Por outro lado, a origem da amostra pode ser o fator determinante das divergências. Islam et al. (2012), agrupou isolados de Las estudados

em três grandes grupos, sendo 1) isolados do Brasil, Flórida, China e outros países asiáticos, 2) Flórida e 3) Índia. Dois isolados com ORFs divergentes em relação aos demais (psy62 e UF506), são provenientes da Flórida (DUAN et al., 2009; ZHANG et al., 2011). O isolado mais divergente é da Índia (Poona), porém não há outras sequências deste país para comparação. O isolados Las da China (gxpsy e YCPsy) tiveram sequência idêntica, enquanto o isolado SGCA5 da Califórnia teve uma alteração pontual em comparação aos demais. As amostras de isolados Las do Brasil (2PA e 4PA) foram idênticas.

4.7.2. Análise de sequência da colicina de Lam

Constatou-se uma inserção de 138 nucleotídeos na ORF da colicina do isolado São Paulo obtido neste trabalho (plasmídeo pMD3), na posição 1866 a 2003 do consenso (Figura 21). A inserção não altera o quadro de leitura, como observado na Figura 22. Quando comparada com a sequência da ORF lam_678 acesso NC_022793, referente ao sequenciamento genômico do isolado Lam São Paulo (WULFF et al., 2014), esta diferença não era esperada, por ser do mesmo isolado.

Figura 21. Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a colicina la de isolados de Lam. pMD3 (Lam_São_Paulo, amplificado por PCR), em comparação com a sequência do banco de dados (NCBI) da ORF lam_678 (Lam_São_Paulo_NCBI acesso NC_022793). Traços significam ausência de nucleotídeos; asteriscos (*) significam identidade de 100% na comparação vertical. Os números indicados referem-se à sequência consenso do alinhamento. Gerado por CLUSTAL OMEGA.



Fonte: a autora

Figura 22. Alinhamento das sequências de aminoácidos das ORFs relativas a colicina Ia do isolado Lam São Paulo. A ORF clonada em pMD3 (Lam_São_Paulo) em comparação com a sequência do banco de dados lam_678 (Lam_São_Paulo_NCBI acesso NC_022793). Traços significam ausência de nucleotídeos; asteriscos (*) significam identidade no consenso. Os números indicados referem-se à sequência consenso do alinhamento. Gerado por CLUSTAL OMEGA.

Lam_São_Paulo	QARIKAEQQRLEEKRKREAEKQRLEEKQRLEEQQARIKADQQRLEEQQARIKADQQRLEE	600
Lam_São_Paulo_NCBI	QARIKAEQQRLEEKRKREAEKQR-----	563

	572	
Lam_São_Paulo	QQREAEKQRLEEKQRLEEKKEEFKKRLEHINELTKLPEAQADNRFSSISNKGSPSAK	660
Lam_São_Paulo_NCBI	-----LEEKQRLEEKKEEFKKRLEHINELTKLPEAQADNRFSSISNKGSPSAK	614

	810	

Fonte: a autora

Para o caso da ORF em pMD3 (colicina lam_678), a inserção de 138 pb, ausente no sequenciamento massivo obtido por 454 (WULFF et al., 2014) pode estar relacionada a um artefato oriundo do preparo da amostra de metagenômica da sequência depositado no NCBI (WULFF et al., 2014). A sequência consenso obtidas nesta região do genoma são de *contigs* com alta cobertura de sequencias. Cerca de 25% do genoma de Lam São Paulo foi sequenciado via Sanger e poucas variações de nucleotídeos foram encontradas, especialmente em regiões homopoliméricas. Portanto, não esperasse que a discrepância observada seja decorrente do sequenciamento 454 *per se*. A amostra usada na metagenômica foi obtida via extenso protocolo que empregou amplificação isotérmica com a polimerase phi29 em processo de *multi-displacement amplification* (MDA). Neste processo, o *template* de metagenômica (amostras com DNA da planta de vinca e DNA de Lam São Paulo) foi multiplicado via MDA. Suspeita-se que esta região de deleção de 138 bp tenha sido gerada neste processo. A sequência de outro isolado de Lam depositado no NCBI é somente um *draft* (LIN et al., 2013) e não possui a ORF em questão. Portanto para acrescentar informações confiáveis, isolados de Lam mantidos em plantas cítricas na estufa do Fundecitrus (MF02, MF05 e MF06 – Tabela 5) foram analisados para a ORF lam_678 (Figura 23).

Figura 23. Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a colicina Ia de isolados de Lam para a confirmação da inserção de 138 pb. ORF do plasmídeo pMD3 (Lam_São_Paulo), e ORF lam_678 de metagenômica (Lam_São_Paulo_NCBI acesso NC_022793) em comparação com a sequência das ORFs dos isolados MF02, MF05 e MF06 (isolado de Las mantidos em plantas em estufa no Fundecitrus). Traços significam ausência de nucleotídeos; asteriscos (*) significam identidade de 100% no consenso. Os números indicados referem-se à sequência consenso do alinhamento. Gerado por CLUSTAL OMEGA.



Fonte: a autora

Como é possível observar no alinhamento das sequência da ORF colicina Ia de Lam provindas i) do sequenciamento do plasmídeo pMD3 (isolado São Paulo), ii) do depósito do banco de dados (LAM_RS04705, isolado São Paulo) obtida por metagenômica (WULFF et al., 2014) e ii) obtidas por PCR (utilizando polimerase de alta fidelidade) dos isolados MF02, MF05 e MF06, a real sequência da ORF colicina Ia de Lam é a aquela obtida no plasmídeo pMD3, ou seja, a ORF possui 3.996 pb (3.858 pb + 138 pb) e não 3.858 pb como depositado no NCBI. A ORF colicina de Lam ficou com tamanho mais próximo em relação as ORFs colicina de Las do banco de dados com esta informação.

4.7.3. Análise de sequência das lisozimas de Las

A sequência da ORF de lisozima do isolado Las 4PA (plasmídeo pMD5, Tabela 3), em comparação com as ORFs de Las psy62, gxpsy, FL17, YCPsy, SGCA5 e Ishi-1 não apresentaram *indels*, com identidade de 100% (Figura 24), assim também como acontece para a ORF do plasmídeo pMD17 (Las 3PA) quando comparada com a ORF do isolado Las HHCA.

Figura 24. Alinhamento das sequências de nucleotídeos das ORFs relativas a lisozima de isolados de Las: Las 4PA (ORF em pMD3) e Las 3PA (ORF em pMD15) em comparação com a sequência do banco de dados (NCBI) das ORFs CLIBASIA_04790 (Las psy62) e ED07_RS0204515 (Las HHCA). Traços significam ausência de nucleotídeos; asteriscos (*) significam identidade de 100% na sequência consenso. Gerado por CLUSTAL OMEGA.

Las_psy62	GTGTGTATTATAAACAGAAATAATCATTTGTGAAAAGGATGATAGGCATGAACGGTGAT	60
Las_4PA	ATGTGTATTATAAACAGAAATAATCATTTGTGAAAAGGATGATAGGCATGAACGGTGAT	60
Las_HHCA	-----	0
Las_3PA	-----	0
Las_psy62	GATAAACATAATAAAATACCAAGTTCCTAACGCTCTTATTAAATGCTCAAGGAGTTCGAG	120
Las_4PA	GATAAACATAATAAAATACCAAGTTCCTAACGCTCTTATTAAATGCTCAAGGAGTTCGAG	120
Las_HHCA	-----	0
Las_3PA	-----	0
Las_psy62	GGCCTTAGACTAACAGCTTATCGTGATATCGGAGGTGGTGGTGGACAATTGGCTATGGG	180
Las_4PA	GGCCTTAGACTAACAGCTTATCGTGATATCGGAGGTGGTGGTGGACAATTGGCTATGGG	180
Las_HHCA	-----	0
Las_3PA	-----	0
Las_psy62	CATACTGGCTCAGATGTTACAGAGGGTATGACGATTACAGAAAAAGCAGAGATTTT	240
Las_4PA	CATACTGGCTCAGATGTTACAGAGGGTATGACGATTACAGAAAAAGCAGAGATTTT	240
Las_HHCA	-----ATGACGATTACAGAAAAAGCAGAGATTTT	33
Las_3PA	-----ATGACGATTACAGAAAAAGCAGAGATTTT	33

Las_psy62	TTGCTGAAAGATGCGAGTAAGTCTCTTAATTTACTTTTAGAGTCATCTCCGGCTTTAAAG	300
Las_4PA	TTGCTGAAAGATGCGAGTAAGTCTCTTAATTTACTTTTAGAGTCATCTCCGGCTTTAAAG	300
Las_HHCA	TTGCTGAAAGATGCGAGTAAGTCTCTTAATTTACTTTTAGAGTCATCTCCGGCTTTAAAG	93
Las_3PA	TTGCTGAAAGATGCGAGTAAGTCTCTTAATTTACTTTTAGAGTCATCTCCGGCTTTAAAG	93

Las_psy62	TCAACTAGTGAAAAATCGCTTGGTCGCAGTAGCTGATTTTCGTGTTTAATCTTGGTATCGGA	360
Las_4PA	TCAACTAGTGAAAAATCGCTTGGTCGCAGTAGCTGATTTTCGTGTTTAATCTTGGTATCGGA	360
Las_HHCA	TCAACTAGTGAAAAATCGCTTGGTCGCAGTAGCTGATTTTCGTGTTTAATCTTGGTATCGGA	153
Las_3PA	TCAACTAGTGAAAAATCGCTTGGTCGCAGTAGCTGATTTTCGTGTTTAATCTTGGTATCGGA	153

Las_psy62	AATTATAATAAAAGCACTTTTAAACAACGTGTTGATGCTCAAGATTGGGAAAAAGCCGCT	420
Las_4PA	AATTATAATAAAAGCACTTTTAAACAACGTGTTGATGCTCAAGATTGGGAAAAAGCCGCT	420
Las_HHCA	AATTATAATAAAAGCACTTTTAAACAACGTGTTGATGCTCAAGATTGGGAAAAAGCCGCT	213
Las_3PA	AATTATAATAAAAGCACTTTTAAACAACGTGTTGATGCTCAAGATTGGGAAAAAGCCGCT	213

Las_psy62	GAGGAATGTAAAAATGGACTAAGGCGGGTGGAAAGGTTTGGCCGGGCTTGTAAAAAGG	480
Las_4PA	GAGGAATGTAAAAATGGACTAAGGCGGGTGGAAAGGTTTGGCCGGGCTTGTAAAAAGG	480
Las_HHCA	GAGGAATGTAAAAATGGACTAAGGCGGGTGGAAAGGTTTGGCCGGGCTTGTAAAAAGG	273
Las_3PA	GAGGAATGTAAAAATGGACTAAGGCGGGTGGAAAGGTTTGGCCGGGCTTGTAAAAAGG	273

Las_psy62	CGTGATGCAGAGGTTAAGTTATTGTTAGAAAGTTGA-----	516
Las_4PA	CGTGATGCAGAGGTTAAGTTATTGTTAGAAAGTCACCACCACCACCACCTGA	534
Las_HHCA	CGTGATGCAGAGGTTAAGTTATTGTTAGAAAGTTGA-----	309
Las_3PA	CGTGATGCAGAGGTTAAGTTATTGTTAGAAAGTCACCACCACCACCACCTGA	327

Fonte: a autora

4.8. Análises em ferramentas de predição de função

Para as comparações dos resultados entre as ORFs de colicina Ia de Las, utilizando-se os *softwares* mencionados, foram selecionados os isolados 2PA, Poona, UF506 e gxpsy (Tabelas 5 e 8). Já para as comparações dos resultados das ORFs Lisozima de Las, foram selecionados os isolados 3PA, 4PA, psy62 e HHCA (Tabelas 5 e 10). No caso de Lam, somente os resultados das ORFs dos clones São Paulo foram comparados, sendo a obtida em pMD3 (Tabela 3), e a do banco de dados (Tabela 8).

4.8.1. Predição de domínio transmembrana - TMHMM

De acordo com o TMHMM (*Tied Mixture Hidden Markov Models*), a sequência de aminoácidos da colicina Ia dos isolados Las 2PA (pMD1) e Las Poona (pMD2) possuem 2 hélices transmembranares. O mesmo padrão é observado em Las WSI_05635 (Las gxpsy). Para as sequências da colicina Ia de Lam provenientes do isolado São Paulo, tanto lam_678 (NCBI) quanto a sequência obtida em pMD3 (pMD7 e pMD14), possuem somente 1 hélice transmembranar. A sequência de lisozima dos isolados Las psy62 (CLIBASIA_04790), Las 4PA (pMD5), Las HHCA (ED07_RS0204515) e Las 3PA (pMD17) não possuem hélices transmembranares (Tabela 12).

Tabela 12. Predição de hélices transmembranares nas colicinas de Las e Lam e lisozimas de Las.

ORF/ isolado	nº de hélices transmembranares	Resíduo ^a
pMD1/ Las 2PA	2	4-26 e 31-50
SC1_gp060/ Las UF506	2	4-26 e 31-50
pMD2/ Las Poona	2	4-26 e 31-53
WSI_05635/ Las gxpsy	2	4-26 e 31-50
pMD3/ Lam São Paulo	1	13-35
lam_678/ Lam São Paulo	1	13-35
pMD5/ Las 4PA	0	-
pMD17/ Las 3PA	0	-

^a Aminoácido na porção N-terminal da sequência primária.

Fonte: a autora

Domínios transmembrana (TMD) são compostos em grande parte por resíduos de aminoácidos não-polares e podem atravessar a bicamada lipídica uma ou mais vezes (HILDEBRAND; PREISSNER; FRÖMMEL, 2004).

Diversos tipos de proteínas possuem TMDs, no entanto na literatura não há relatos de bacteriocinas que possuam tais domínios. A predição por *softwares* de bioinformática não garante que a proteína realmente possua TMDs. A verificação da presença de TMD pode ser feita experimentalmente através de ensaios de localização subcelular assim como feito por Lührink et al. (1987) para a proteína de liberação de uma bacteriocina de *E. coli*. Se eventualmente confirmada a presença destes domínios, podem auxiliar a prever a ligação destas proteínas a membranas, com possível ancoragem na membrana plasmática da bactéria.

4.8.2. Identificação de peptídeo sinal - SignalP

Quando submetidas ao software SignalP, a sequência de aminoácidos de SC1_gp060, Las 2PA e Las Poona (pMD1 e pMD2, respectivamente), e WSI_05635 Las gxpsy (acesso AGH17484) indicam a presença de peptídeo sinal, enquanto que para SC1_gp060 o peptídeo sinal é ausente. O resultado indica também a posição de um possível sítio de clivagem, idêntico nas três sequências que possuem o peptídeo sinal (WSI_05635 e pMD1 e pMD2). Na Figura 25, a sequência dos 60 aminoácidos N-terminais das sequências em questão, mostra diferenças nos resíduos 17, 18 e 19 para o isolado UF506 que possivelmente estão ligadas a ausência de sítio de clivagem para peptídeo sinal na ORF SC1_gp060.

Para as sequências de aminoácidos em lam_678 de Lam São Paulo (acesso AHA28024) e Lam São Paulo (pMD3), e CLIBASIA_04790 de Las 4PA (pMD5), o resultado para peptídeo sinal foi negativo (Tabela 13).

Tabela 13. Predição de peptídeo sinal nas colicinas de Las e Lam e lisozima de Las

ORF/ isolado	Peptídeo sinal	Sítio de clivagem ^a
pMD1/ Las 2PA	Sim	Entre resíduos 24 e 25
SC1_gp060/ Las UF506	Não	-
pMD2/ Las Poona	Sim	Entre resíduos 24 e 25
WSI_05635/ Las gxpsy	Sim	Entre resíduos 24 e 25
pMD3/ Lam São Paulo	Não	-
lam_678/ Lam São Paulo	Não	-
pMD5/ Las 4PA	Não	-
pMD17/ Las 3PA	Não	-

^a Aminoácido na porção N-terminal da sequência primária.

Fonte: a autora

Figura 25. Alinhamento dos 60 resíduos da porção N-terminal das colicina Ia de isolados de Las. SC1_gp060, Las 2PA e Las Poona (pMD1 e pMD2) em comparação com a sequência do NCBI de SC1_gp060 (Las UF506 acesso ADV02637) e WSI_05635 (Las gxpsy acesso AGH17484). A seta indica o local onde existem três aminoácidos diferentes para o isolado Las UF506. Asteriscos (*) indicam identidade de 100% no consenso. Gerado por CLUSTAL OMEGA

posições 17, 18 e 19 diferentes em UF506		↓	↓	possível sítio de clivagem	
Las_Poona	MGFWNSITSIAATVGAGLATVATAAALATPIGWGAAGVGAAGVAGAGASGLAMHKMRE				60
Las_2PA	MGFWNSITSIAATVGAGLATVATAAALATPIGWGAAGVGAAGVAGAGASDLAMHKMRE				60
Las_gxpsy	MGFWNSITSIAATVGAGLATVATAAALATPIGWGAAGVGAAGVAGAGASDLAMHKMRE				60
Las_UF506	MGFWNSITSIAATVGAVGTVATAAALATPIGWGAAGVGAAGVAGAGASDLAMHKMRE				60
	***** : *****				

Fonte: a autora

Nas células, as proteínas entram na via secretória, em grande parte dos casos, se possuírem um sinal-alvo específico: um peptídeo sinal (PS) (HEIJNE, 1990). Um PS pode ser descrito como uma extensão da porção N - terminal da proteína, que pode variar de 15 a mais de 50 resíduos, e é clivado por enzimas conhecidas como peptidases (HEIJNE, 1990; MARTOGLIO; DOBBERSTEIN, 1998). Na literatura, alguns trabalhos relacionam peptídeos sinais à bacteriocinas. Enquanto que a maioria das proteínas secretadas, utilizam via de exportação geral dependente de peptídeo sinal, algumas bacteriocinas como a colicina V, utilizam uma via independente de peptídeo sinal (HAVARSTEIN; HOLO; NES, 1994). Ainda mais, para o caso das colicinas, os trabalhos evidenciam a presença de um peptídeo sinal na proteína de lise presente no *operon* Col (HOWARD; LINDSAY, 1998; KANO et al., 1991).

Nas sequências estudadas, a presença do peptídeo sinal e sítio de clivagem preditos pode ser indício de que utilizam via de secreção dependente de peptídeo

signal e sofrem clivagem por peptidases. No entanto as previsões feitas por bioinformática, como já mencionado, não condizem com a realidade em 100% dos casos, tendo que se verificar experimentalmente (ZHANG; HENZEL, 2004).

4.8.3. Predição de homologia de estrutura terciária - HHpred

O HHpred é uma ferramenta que, dentre outras coisas, abrange pesquisa de homologia, prevê a conformação terciária e classifica as sequências proteicas. O resultado apresentado quando as sequências foram submetidas ao software está indicando na Tabela 14.

Tabela 14. Predição de homologia da estrutura terciária nas colicinas Ia de Las e Lam e lisozima de Las

ORF/ isolado	Hit	Nome	Probabilidade (%)
pMD1/ Las 2PA	1CII_A	<i>colicin ia; colicin, bacteriocin,</i>	38,29
SC1_gp060/ Las UF506	1COL_A	<i>colicin a (c-terminal domain)</i>	34,83
pMD2/ Las Poona	1CII_A	<i>colicin ia; colicin, bacteriocin</i>	31,13
WSI_05635/ Las gxpsy	1CII_A	<i>colicin ia; colicin, bacteriocin</i>	38,70
pMD3/ Lam São Paulo	2B5U_A	<i>colicin e3 (e.c.3.1.-.-), colicin e3</i>	69,73
lam_678/ Lam São Paulo	1CII_A	<i>colicin ia; colicin, bacteriocin,</i>	38,43
pMD5/ Las 4PA	1XJU_A	<i>lysozyme (e.c.3.2.1.17); secreted inactive conformation</i>	100,00
pMD17/ Las 3PA	1XJU_A	<i>lysozyme (e.c.3.2.1.17), secreted inactive conformation</i>	99,89

Fonte: a autora

Os resultados apresentados para as possíveis colicinas de Las estudadas neste trabalho mostram baixa homologia (<40%) com as estruturas das colicinas caracterizadas e depositadas no banco de dados do HHpred. Para a colicina de Lam, o valor é maior, quase 70%. Já no caso das lisozimas, ambas obtiveram resultados

maiores que 99% (99,89 e 100,00%), indicando alta homologia com as estruturas de outras lisozimas já caracterizadas e depositadas.

O resultado referente à similaridade da estrutura das proteínas estudadas neste trabalho com outras colicinas, apesar de considerado baixo, não deve ser utilizado sozinho para descartar a possibilidade de serem de fato bacteriocinas do tipo colicina. Existem alguns trabalhos de caracterização funcional com base nos genes de profagos descritos por Zhang et al. (2011) que comprovaram a função putativa dos mesmos. Fleites et al. (2014) comprovaram através de indução, que os genes estudados (holina SC1_gp110, endolisina SC1_gp035 e lisozima CLIBASIA_04790) cessaram o crescimento de células de *E. coli*, demonstrando atividade consistente com suas funções putativas descritas, de holina e endolisina. Jain et al. (2015) constataram a funcionalidade da ORF no profago SC2 (SC2_gp095) com atividade de peroxidase, comprovando a função predita. Portanto, a caracterização funcional se configura como necessária e indispensável para constatar, juntamente com dados de bioinformática, a função de uma proteína putativa, sendo este um ponto de partida.

4.9. Expressão heteróloga das proteínas recombinantes em *E. coli* BL21 (DE3) utilizando construções em pET28a

Para verificar a possível toxicidade das proteínas relativas às ORFs colicina Ia de Las e Lam e lisozima de Las obtidas em pET28a a partir dos isolados 2PA (pMD13), Poona (pMD16), São Paulo (pMD14), 4PA (pMD15) e 3PA (pMD17), foram realizados experimentos de indução de expressão em *E. coli* BL21 (DE3) com IPTG.

Para a indução das lisozimas foram utilizados três controles, sendo BL21(DE3) sem pET28a, BL21 (DE3) + pET28a e BL21 (DE3) + pMD19, e dois testes, sendo BL21 (DE3) + pMD15 e BL21 (DE3) + pMD17. Para a indução das colicinas foram utilizados os mesmos controles citados acima e três testes, sendo BL21 (DE3) + pMD13, BL21 (DE3) + pMD16 e BL21 (DE3) + pMD14. Os experimentos foram realizados em triplicata, com a realização de dois ensaios.

Os valores de densidade óptica de cultura, obtidos para cada controle e teste nos tempos t_i , t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4 e t_5 foram submetidos a uma análise de variância com medidas repetidas no tempo (Tabelas 16 e 18). Quando significativo ($P < 0,05$), as médias ($\bar{x}$) foram comparadas pelo teste LSD de Fisher (Tabelas 15 e 17).

4.9.1. Expressão heteróloga das lisozimas

A Tabela 15, mostra a comparação de médias feita pelo teste LSD de Fisher para as repetições 1 e 2 (R1 e R2) realizadas para os clones de lisozima, onde os valores das médias apresentados foram comparados nas linhas entre os controles e os testes para R1 e R2 (letras minúsculas) e nas colunas entre os tempos (letras maiúsculas) t₀ (0 min), t₀ (120 min), t₁ (180 min), t₂ (240 min), t₃ (300 min), t₄ (360 min) e t₅ (420 min). Médias seguidas pela mesma letra minúscula (na coluna) ou maiúscula (entre colunas) não diferem estatisticamente pelo teste LSD ($P < 0,05$).

Tabela 15. Comparação dos valores médios de absorbância dos clones de lisozima^x ao longo do tempo para cada uma das repetições^y

Clones	Tempo (min)						
	0	120	180	240	300	360	420
R1^y							
BL21	0,028 aA	0,368 aB	1,643 aC	1,883 aD	2,222 aE	2,390 aF	2,556 aG
pET28a	0,018 aA	0,360 aB	1,538 aC	1,863 aD	2,129 aE	2,243 bF	2,527 aG
pMD19	0,015 aA	0,390 aB	1,509 bC	1,660 dD	1,809 dE	2,099 eF	2,414 dG
pMD15	0,016 aA	0,373 aB	1,028 dC	1,052 cCD	1,033 cCD	1,105 dD	1,061 cCD
pMD17	0,018 aA	0,556 bB	0,801 cC	0,767 bC	0,832 bC	0,774 cC	0,808 bC
R2^y							
BL21	0,016 aA	0,224 aB	0,934 aC	1,332 aD	1,644 aE	1,995 aF	2,383 aG
pET28a	0,012 aA	0,225 abB	0,862 bC	1,462 bD	1,835 bE	2,187 bF	2,632 bG
pMD19	0,013 aA	0,266 abcB	0,910 abC	1,387 aD	1,682 aE	1,932 eF	2,259 eG
pMD15	0,013 aA	0,280 bcB	0,867 bC	1,032 dD	1,041 dD	0,960 dE	0,954 dE
pMD17	0,012 aA	0,312 cB	0,625 cCD	0,589 cC	0,619 cCD	0,636 cCD	0,642 cD

^y cada repetição foi analisada separadamente.

Fonte: a autora

As medidas que geraram as médias apresentadas na Tabela 15 foram utilizadas para o cálculo de variância, cujos resultados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados da análise de variância para lisozima com medidas repetidas no tempo comparando a absorbância (OD₆₀₀) dos clones (controle e teste) ao longo do tempo (min.)

Fator	Lisozima		
	GL	F	P
R1^Y			
Clone	4, 10	352,73	<0,0001
Tempo	6, 60	3659,90	<0,0001
Clone x Tempo	24, 104	188,31	<0,0001
R2^Y			
Clone	4, 25	1060,22	<0,0001
Tempo	6, 150	7056,77	<0,0001
Clone x Tempo	24, 209	439,38	<0,0001

^Y cada repetição foi analisada separadamente

GL – Grau de Liberdade

F – teste F

P – Probabilidade

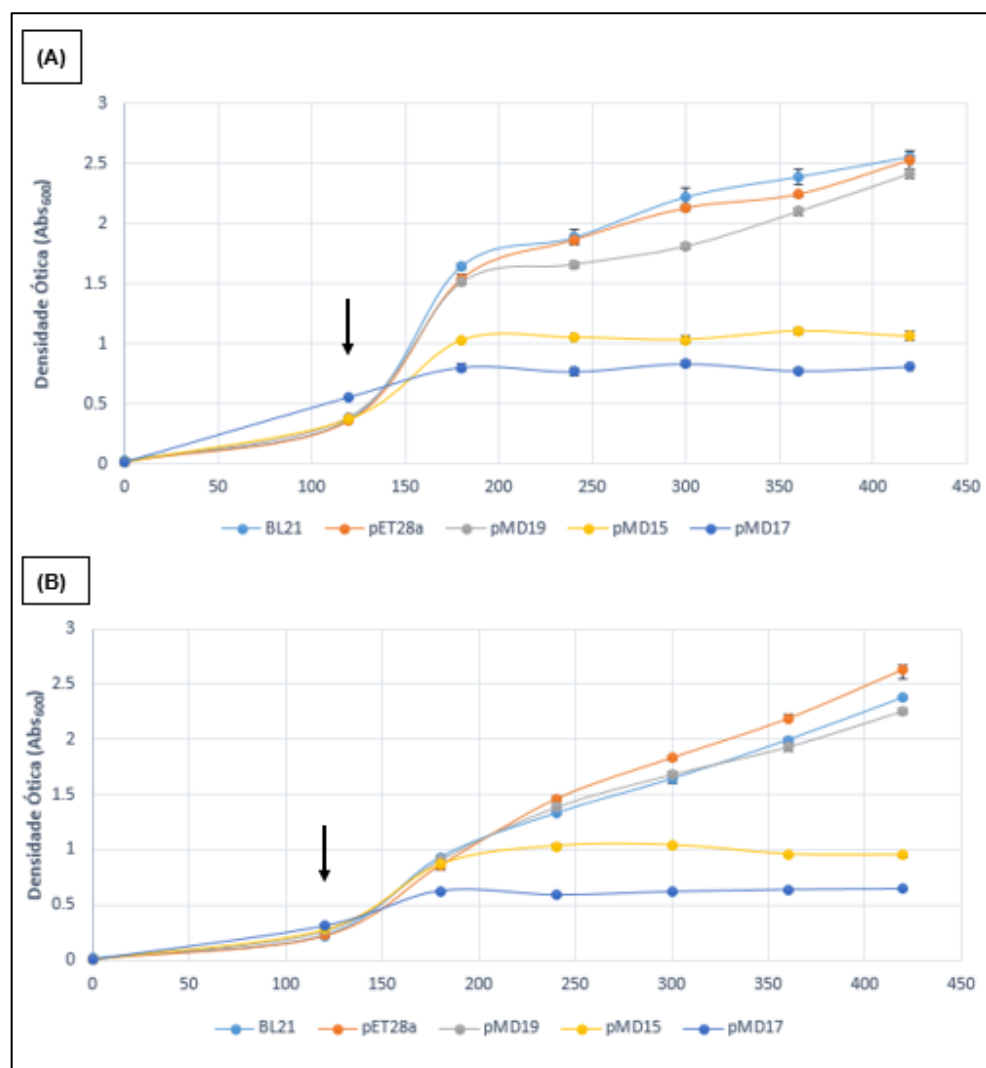
Fonte: a autora

Na Tabela 15, a comparação de médias das medidas de OD₆₀₀ entre os clones teste de lisozima e os controles no tempo t_i (0 min) mostra que estes não diferem entre R1 e R2 indicando homogeneidade no início do experimento. Em t₀ (120 min) é possível verificar diferença, principalmente entre os testes e controles nas duas repetições (R1 e R2). Como se pode observar, em R1 e R2 pMD17 mostrou crescimento maior que o outro teste, pMD15, e que os controles, BL21, pET28a e pMD19.

No t₁ (180 min), que representa o crescimento das células após 1 h da indução das ORFs de lisozima com IPTG, pode-se notar, em R1, uma diferença de crescimento de cerca de 34% e 48% para pMD15 e pMD17 respectivamente em relação aos três controles. Já em R2 essa diferença cai para 3% e 30% para os testes em relação aos controles, sendo a primeira diferença baixa se comparada à correspondente em R1, um possível erro experimental. Nos tempos subsequentes, t₂ (240 min), t₃ (300 min), t₄ (360 min) e t₅ (420 min) notou-se um aumento progressivo nas diferenças de crescimento dos testes em relação aos controles para R1 e R2, sendo as médias na ordem de 1,10 e 1,05 em R1 e 1,33 e 1,08 em R2 para pMD15 e pMD17 respectivamente. No último tempo, t₅ (420 min), a média de diferença de crescimento entre os controles e os testes foi de 57% e 67% em R1 e 60% e 73% em

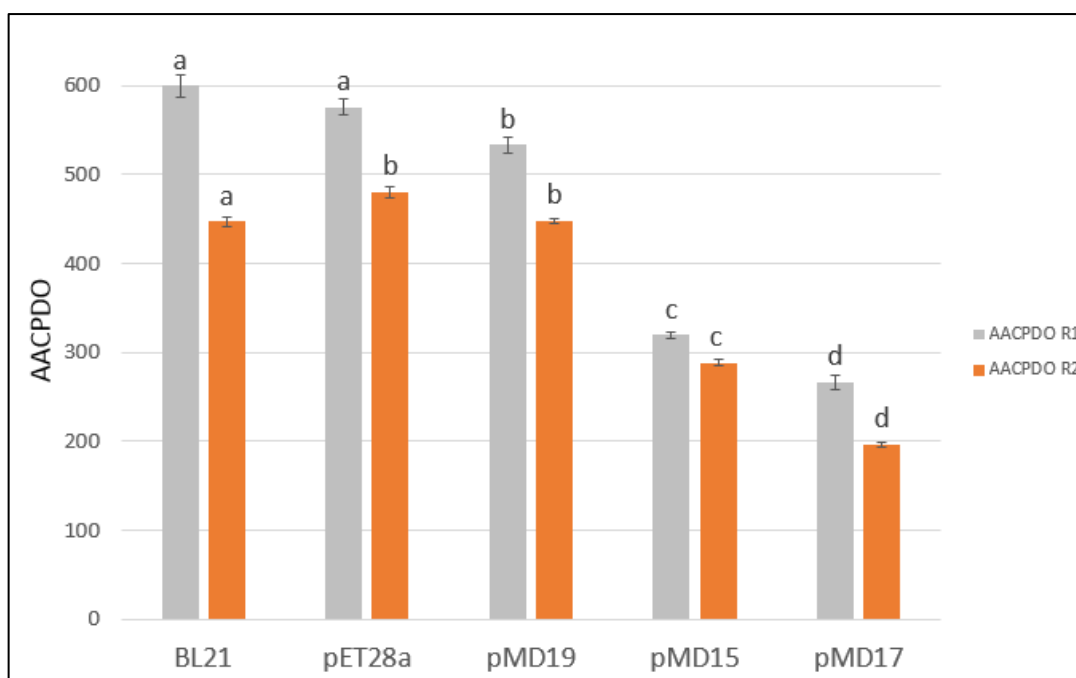
R2 para pMD15 e pMD17 respectivamente. Ao comparar os tempos somente para pMD15 e pMD17 observa-se que houve uma estagnação no crescimento a partir do t₂ (240 min) tanto em R1 quanto em R2. As Figuras 26A e 26B mostram a cinética de crescimento para os controles e testes ao longo do tempo e a Figura 27 mostra a Área Abaixo da Curva do Progresso da Densidade Ótica (OD₆₀₀) AACPD.

Figura 26. Cinética de crescimento de *E. coli* BL21 (DE3) expressando lisozimas de Las. Repetição 1 R1 (A) e repetição 2 R2 (B). As setas indicam o momento da indução com IPTG. O erro padrão foi calculado com base nas médias ($\bar{x}$).



Fonte: a autora.

Figura 27. Área abaixo da Curva de Progresso da Densidade Ótica (AACPD) para lisozima de Las em R1 e R2. O erro padrão foi calculado com base nas médias ($\bar{x}$)



Fonte: a autora

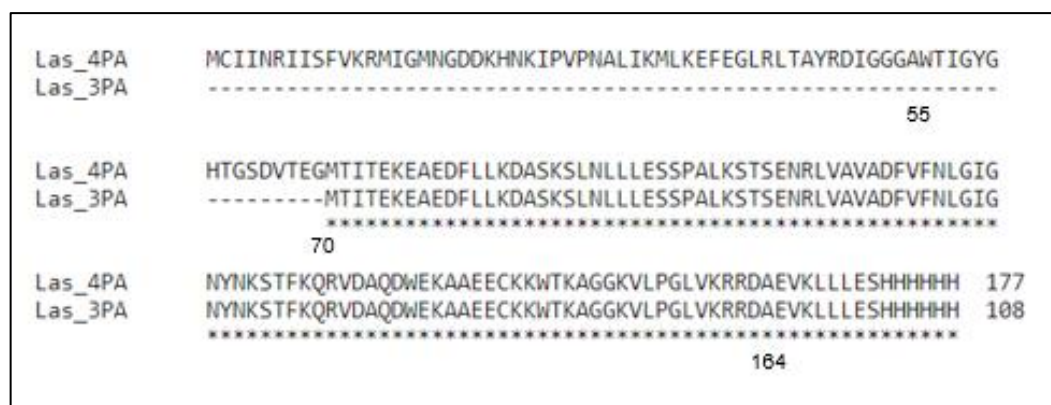
Com base nas análises estatísticas (Tabela15) e suas representações gráficas (Figuras 26 e 27), de modo geral, os controles não mostram grandes diferenças de crescimento quando comparados entre si. Porém, pMD15 e pMD17 mostram diferenças evidenciadas no teste estatístico quando comparados aos controles. Essas diferenças podem ser resultado do efeito tóxico da expressão das proteínas relativas às ORFs de lisozima CLIBASIA_04709 e ED07_RS0204515 em *E. coli* BL21 (DE3).

Fleites et al. (2014) em ensaio para avaliar o efeito tóxico da lisozima CLIBASIA_04790 obtiveram resultado semelhante, sendo que foi observado uma redução de 12,8% no crescimento da *E. coli* BL21(DE3) após indução com IPTG. O efeito tóxico das lisozimas relacionadas a profagos ou bacteriófagos também foi constatado por Lavigne et al. (2004), Kim et al. (2004), Junn et al. (2005) e Lee et al. (2006), em *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas oryzae*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Erwinia amylovora*, respectivamente.

Em relação à funcionalidade de ED07_RS0204515 (pMD17), mesmo possuindo 69 aa a menos em relação à CLIBASIA_RS04790 (pMD15), a proteína relacionada a esta ORF apresentou-se tóxica, com uma tendência a afetar de uma

forma mais expressiva o crescimento da *E. coli* BL21(DE3). A comparação de domínios proteicos conservados (NCBI) mostrou que ambas as proteínas possuem os domínios essenciais para o desempenho lítico da lisozima. Quando comparadas pela sequência de aa, possuem identidade de 100% a partir do resíduo 70, que é o início da ORF menor em pMD17 (ED07_RS0204515) (Figura 28). Os resultados da busca no banco de dados do NCBI (*conserved domains* - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>) mostrou que para CLIBASIA_04790 (pMD15) o domínio *Phage_lysozyme*, acesso: pfam00959, tem início no resíduo 55 e se prolonga até o resíduo 162, enquanto que para ED07_RS0204515 (pMD17) o mesmo domínio tem início no resíduo 1 (70 no consenso) e se prolonga até o resíduo 95 (164 no consenso) indicando que as sequências compartilham 107 resíduos do domínio proteico.

Figura 28. Alinhamento das sequências de aminoácidos das ORFs relativas a lisozima la dos isolados 3PA e 4PA. ORF clonada em pMD15 (Las 4PA) em comparação com a sequência da ORF clonada em pMD17 (Las 3PA). Traços significam ausência de nucleotídeos; asteriscos (*) significam identidade no consenso. Os números indicados referem-se à sequência consenso do alinhamento Gerado por CLUSTAL OMEGA.



Fonte: a autora

4.9.2. Expressão heteróloga das colicinas

A Tabela 17, mostra a comparação de médias feita pelo teste LSD de Fisher para as repetições (R) realizadas para os clones de colicina, onde os valores das médias apresentados foram comparados nas linhas entre os controles e os testes para R1 e R2 (letras minúsculas) e nas colunas entre os tempos (letras maiúsculas) ti (0

min), t0 (120 min), t1 (180 min), t2 (240 min), t3 (300 min), t4 (360 min) e t5 (420 min). Médias seguidas pela mesma letra minúscula (na coluna) ou maiúscula (entre colunas) não diferem estatisticamente pelo teste LSD ($P < 0,05$).

Tabela 17. Comparação dos valores médios de absorbância dos clones de colicina^X ao longo do tempo para cada uma das repetições^Y

Clones	Tempo (min)						
	0	120	180	240	300	360	420
R1^Y							
BL21	0,045 aA	0,551 aB	1,283 aC	1,540 aD	2,126 aE	2,216 abE	2,651 aF
pET28a	0,026 aA	0,511 aB	1,360 aC	1,632 aD	2,120 aE	2,236 aE	2,525 aF
pMD19	0,023 aA	0,471 aB	1,313 aC	1,576 aD	2,003 aD	2,035 cE	2,508 aF
pMD13	0,018 aA	0,450 aB	1,543 bC	1,852 aD	1,986 aDE	2,066 bcE	2,495 aF
pMD16	0,021 aA	0,553 aB	0,701 aCD	0,842 aE	0,761 aCD	0,640 dBC	0,783 cDE
pMD14	0,021 aA	0,516 aB	1,303 aC	1,564 aD	2,076 aE	2,190 abcE	2,201 bE
R2^Y							
BL21	0,010 aA	0,576 aB	1,325 abC	1,669 aD	2,169 aE	2,256 aF	2,686 aG
pET28a	0,030 aA	0,624 abB	1,358 aC	1,961 bD	2,246 aE	2,326 aF	2,516 bG
pMD19	0,030 aA	0,568 aB	1,243 bcC	1,860 dD	1,967 bE	2,091 bF	2,148 cF
pMD13	0,028 aA	0,636 abB	1,344 aC	1,760 acD	1,974 bE	2,116 bF	2,202 cG
pMD16	0,020 aA	0,681 bB	0,871 dC	0,894 eC	0,971 cD	0,924 cCD	0,670 eB
pMD14	0,016 aA	0,608 abB	1,216 cC	1,825 cdD	2,190 aE	2,343 aF	2,390 dF

^Y cada repetição foi analisada separadamente.

Fonte: a autora

As medidas que geraram as médias apresentadas na Tabela 17 foram utilizadas para o cálculo de variância, cujos resultados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados da análise de variância para colicina com medidas repetidas no tempo comparando a absorbância (OD₆₀₀) dos clones (controle e teste) ao longo do tempo (min).

Fator	Colicina		
	GL	F	P
R1 ^Y			
Clone	5, 12	107,18	<0,0001
Tempo	6, 72	1633,91	<0,0001
Clone x Tempo	30, 125	38,74	<0,0001
R2 ^Y			
Clone	5, 30	240,30	<0,0001
Tempo	6, 180	5195,99	<0,0001
Clone x Tempo	30, 251	118,60	<0,0001

^Y cada repetição foi analisada separadamente.

GL – Grau de Liberdade

F – teste F

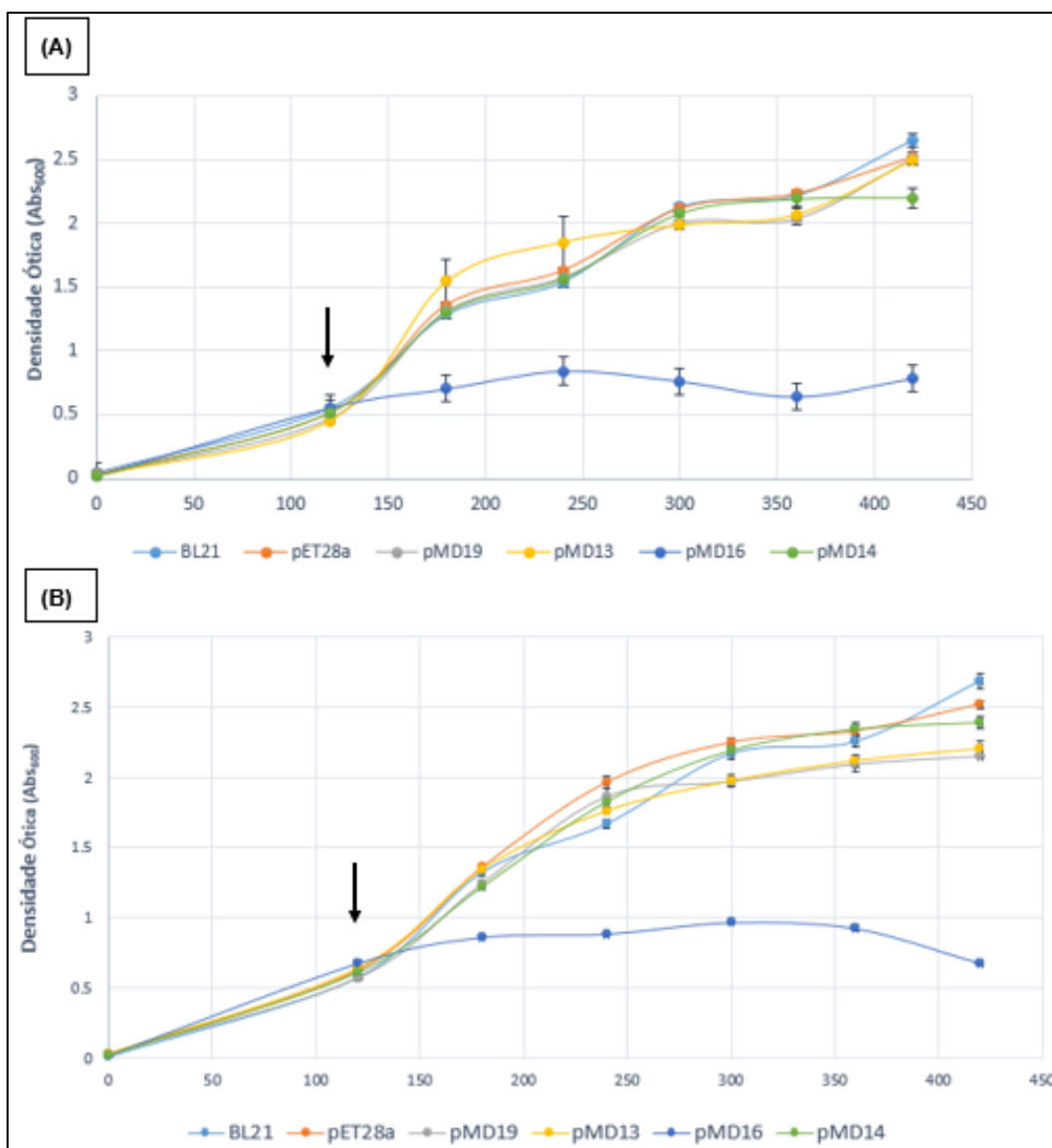
P – Probabilidade

Fonte: a autora

Na tabela 17, a comparação de médias das medidas de OD₆₀₀ entre os clones teste de colicina e os controles no tempo t_i (0 min) mostra, assim como acontece para lisozima, que não diferem entre R1 e R2 indicando homogeneidade no início do experimento. No t₀ (120 min) enquanto que para R1 não se observa diferença estatística entre os testes e os controles, em R2 há uma leve variação.

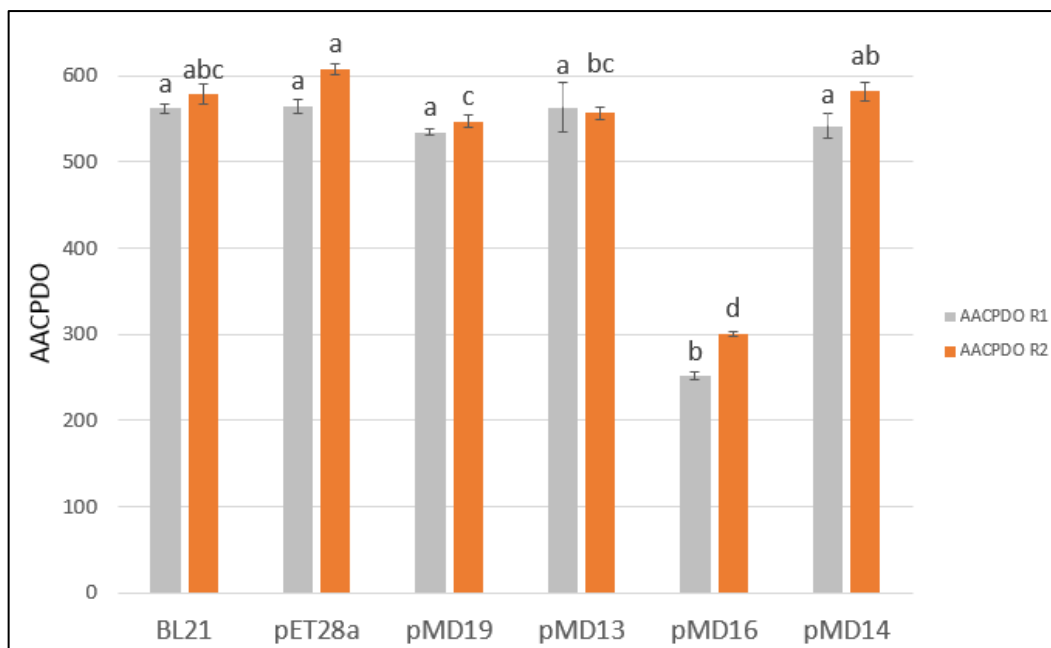
No t₁ (180 min) que representa o crescimento das células após 1h de indução da expressão das ORFs de colicina, é possível notar, uma diferença de crescimento de cerca de 46% e 42%, respectivamente em R1 e R2, para pMD16 em relação aos três controles e aos outros 2 testes. Os testes pMD13 (SC1_gp060 de isolado 2PA) e pMD14 (ORF lam_678 de isolado São Paulo) não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos controles. Nos tempos subsequentes, t₂ (240 min), t₃ (300 min), t₄ (360 min) e t₅ (420 min) as taxas de aumento progressivo para a diferença de crescimento de pMD16 (SC1_gp060 de isolado Poona), em relação aos controles e aos outros testes foi em média de 1,15 em R1 e 1,09 em R2. No tempo t₅ (420 min), a média de diferença de crescimento entre pMD16, os controles e os outros testes foi de cerca de 70% tanto em R1 quanto em R2. As Figuras 29A e 29B mostram a cinética de crescimento para os controles e testes ao longo do tempo e a Figura 30 mostra a Área Abaixo da Curva do Progresso da Densidade Ótica (OD₆₀₀) AACPD.

Figura 29. Cinética de crescimento de *E coli* BL21 (DE3) expressando colicinas putativas de Las e Lam. **(A)** R1. **(B)** R2. As setas indicam o momento da indução com IPTG. O erro padrão foi calculado com base nas médias ($\bar{x}$).



Fonte: a autora

Figura 30. Área abaixo da Curva de Progresso da Densidade Ótica (AACPD) para colicinas putativas de Las e Lam em R1 e R2. O erro padrão foi calculado com base nas médias ($\bar{x}$)



Fonte: a autora.

As culturas de *E. coli* testes contendo plasmídios pMD19 ou pMD14, respectivamente SC1_gp060 de isolado Las 2PA e lam_678 de isolado São Paulo, não mostram diferenças de crescimento quando comparados os controles (Figuras 29 e 30). Entretanto, pMD16 (SC1_gp060 do isolado Las Poona), mostrou diferença quando comparado aos controles e aos outros testes (Figuras 29 e 30). Essa diferença evidencia o efeito tóxico da proteína relativa à ORF SC1_gp060 do isolado Poona sob a *E. coli* BL21 (DE3) o que reforça a suposição de que se trata de uma bacteriocina.

Como todas as clonagens em pET28a seguiram o mesmo padrão e confirmadas através de digestão com enzimas de restrição e sequenciamento, é mínima a possibilidade de incorreções no desenho das clonagens ou na preparação dos plasmídeos. Assim, o fato das outras ORFs com similaridade a bacteriocinas não terem tido efeito, levanta a possibilidade de i) especificidade das possíveis bacteriocinas às Liberibactérias, o que explicaria a falta de toxicidade na *E. coli* BL21 (DE3), representando uma questão evolutiva entre estas bactérias; ou ii) diferenças na sequência da ORF do isolado Lam em relação a ORF de Las, e entre os isolados de Las, visto que a ambas possuem inserções e deleções quando comparadas (Tabela 8 e Figuras 19 e 21).

As questões levantadas acima podem ser futuramente desvendadas pela expressão heteróloga das proteínas referentes às ORFs putativas de colicina em Lcr BT-1. No presente trabalho não foi possível obter colônias transformantes de Lcr contendo os genes de bacteriocinas ou de lisozimas clonados em pUFR071, similar ao obtido por Fleites et al. (2014) e Jain et al. (2015). Experimentos de transformação genética com os plasmídeos pMD7, pMD8, pMD9 e pMD12 (Tabela 3) não geraram colônias com a esperada resistência aos antibióticos.

4.10. Análise da produção de proteínas por SDS-PAGE e Western-blotting

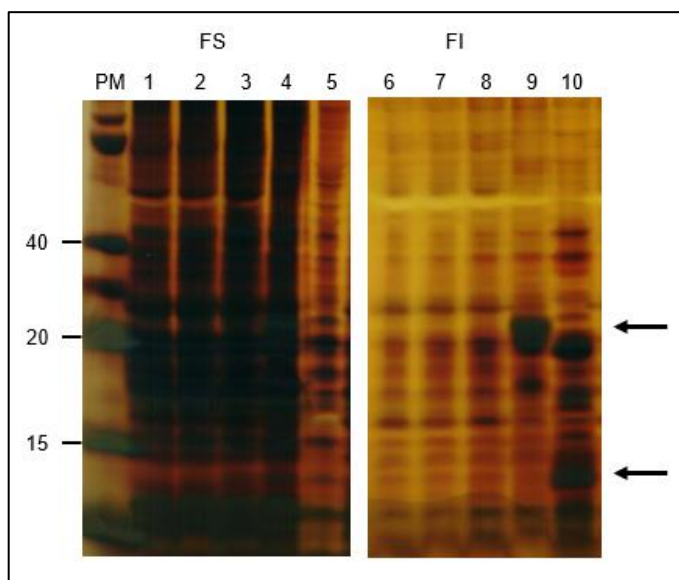
A confirmação da expressão das lisozimas e colicinas foi feita por SDS-PAGE e posteriormente Western-blotting utilizando anticorpo anti-His6x. As frações solúvel (FS) e insolúvel (FI) obtidas a partir dos pellets das culturas induzidas, controles e testes, foram aplicadas em gel de poliacrilamida e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose.

As lisozimas recombinantes presentes em pMD15 (CLIBASIA_RS04790 Las 4PA) e pMD17 (ED07_RS0204515 Las 3PA), tem 20 kDa e 12 kDa, respectivamente, e as colicinas la putativas recombinantes presentes em pMD13 (SC1_gp060 Las 2PA), pMD16 (SC1_gp060 Las Poona) e pMD14 (lam_678 Lam São Paulo) tem massa estimada de 154 kDa (item 3.5).

4.10.1. SDS-PAGE e Western-blotting - lisozimas

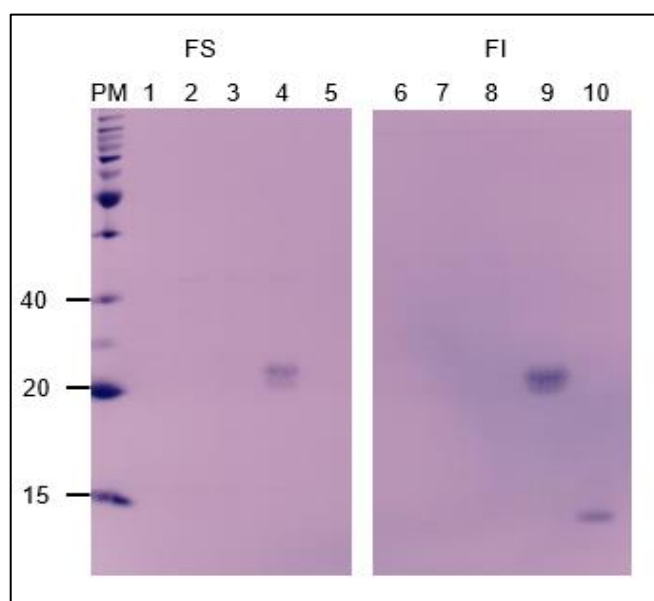
As frações proteicas obtidas foram FS (fração solúvel) e FI (fração insolúvel) sendo que a FI foi solubilizada pela adição de uréia (item 3.9) para a análise em SDS-PAGE. Ambas as frações foram separadas em eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) (Figura 31), transferidas para membrana de nitrocelulose e marcadas com anticorpo anti-His6X (Figura 32). Foi possível observar tanto no gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) corado com prata, quanto na membrana de Western-blotting, as proteínas recombinantes nas faixas de 20 kDa e 12 kDa, em tamanho previsto (item 3.5) e como descrito por outros autores na literatura para lisozimas relacionadas à profagos (LAVIGNE et al., 2004; JUNN et al., 2005; LEE et al., 2006).

Figura 31. SDS-PAGE das proteínas recombinantes lisozima de Las. FS: BL21 (canaleta 1), pET28a (canaleta 2), pMD19 (canaleta 3), pMD15 (canaleta 4; CLIBASIA_04790), pMD17 (canaleta 5; ED07_RS0204515); FI: BL21 (canaleta 6), pET28a (canaleta 7), pMD19 (canaleta 8), pMD15 (canaleta 9; CLIBASIA_04790), pMD17 (canaleta 10; ED07_RS0204515). As setas indicam as lisozimas expressas, de 20 e 12 kDa PM: Peso molecular Benchmark™ Invitrogen®.



Fonte: a autora

Figura 32. Western-blot das proteínas recombinantes lisozima de Las. FS: BL21 (canaleta 1), pET28a (canaleta 2), pMD19 (canaleta 3), pMD15 (canaleta 4; CLIBASIA_04790), pMD17 (canaleta 5; ED07_RS0204515); FI: BL21 (canaleta 6), pET28a (canaleta 7), pMD19 (canaleta 8), pMD15 (canaleta 9; CLIBASIA_RS04790), pMD17 (canaleta 10; ED07_RS0204515). As setas indicam as lisozimas expressas de 20 e 12 kDa. PM: Peso molecular Benchmark™ Invitrogen®.



Fonte: a autora

Como é possível observar pelas Figuras 31 e 32 (SDS-PAGE e membrana de Western-Blotting respectivamente), a maior quantidade de lisozima, tanto para pMD15 (CLIBASIA_04790) quanto pMD17 (ED07_RS0204515), foi observada na FI do extrato proteico (indicadas pelas setas nas canaletas 9 e 10), podendo ter sido formados corpos de inclusão. A segregação de proteínas em agregados insolúveis conhecidos como corpos de inclusão ocorre principalmente pela alta taxa de expressão heteróloga (BANEYX, 1999; SINGH, et al., 2015). Junn et al. (2005) e Lee et al. (2006) observaram o aumento da insolubilização como consequência da formação de corpos de inclusão das lisozimas do fago K11 e do fago Xo411 expressas em *E. coli* quando a 37° C. Para a lisozima do fago K11, quando a temperatura de crescimento foi diminuída para 30° C e 25° C foi possível observar no gel de SDS-PAGE a proteína recombinante nas frações solúvel e insolúvel (JUNN et al., 2005). Sendo estas duas temperaturas observadas também como ótimas para a atividades da proteína recombinante do fago Xo411 (LEE et al., 2006).

Para a realização de teste de atividade enzimática das lisozimas, o ideal é que sejam realizados experimentos para aumentar a expressão das proteínas recombinantes, preferencialmente na forma solúvel e realizar a purificação da proteína em cromatografia de afinidade. Apesar da purificação de proteínas a partir de frações insolúveis seja possível, não há garantias de atividade proteica em função de sua solubilização (BANEYX, 1999).

A fusão de uma *His-tag* às proteínas recombinantes permite além da detecção por Western-blotting, imobilização por níquel visando a purificação das mesmas através de cromatografia metálica (PRYOR; LEITING, 1996). A partir das proteínas purificadas pode-se então obter anticorpos e assim utilizá-los para verificação de expressão em plantas e psilídeos, assim como também em plantas transgênicas pensando no possível uso biotecnológico destes genes.

4.10.2. SDS-PAGE e Western-blotting - colicinas

Para os clones-teste expressando as colicinas putativas de Las e Lam (BL21(DE3) / pMD13, BL21(DE3) / pMD14 e BL21(DE3) / pMD16) não foi possível verificar nenhuma proteína diferente no gel SDS-PAGE em relação aos controles (FS e FI), mesmo para a cultura que mostrou atividade tóxica verificada pela medição da

OD₆₀₀. Na análise de Western-blotting somente o peso molecular foi marcado (dados não mostrados). Mesmo a utilização de precipitação proteica para concentrar a proteína, tanto de FI e FS quando do sobrenadante das culturas induzidas (itens 3.8 e 3.9), não resultou em bandas com intensidade diferentes dos controles no gel ou membrana de Western-blotting.

Um teste realizado com diferentes concentrações de IPTG, sendo 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM e 1,5 mM nas temperaturas de 28° C e 37° C também não gerou resultados que evidenciassem a produção da proteína recombinante (dados não mostrados).

A não detecção das proteínas em ambos os ensaios, pode ser principalmente devido à, no caso de SC1_gp060 (pMD16), i) atividade da proteína como bacteriocina, resultando em baixa expressão e quantidade da mesma ou, no caso de SC1_gp060 (pMD16), SC1_gp060 (pMD13), ou lam_678 (pMD14), ii) formação de complexos ou agregados com proteínas de membrana, o que impediria sua resolução em gel, aliado ao seu tamanho (154 kDa). Uma alternativa para tal problema seria a purificação em coluna por afinidade metálica, utilizando-se a *His-tag* fusionada a porção C-terminal das proteínas (PRYOR; LEITING, 1996). Assim também como no caso das lisozimas, a produção de anticorpos serviria para a identificação da presença destas proteínas na sua forma original pela expressão em Las e Lam.

5. CONCLUSÕES

As proteínas correspondentes às ORFs estudadas neste trabalho foram eficientemente expressas em sistema heterólogo bacteriano, utilizando *E. coli* BL21 (DE3).

Pôde-se verificar em SDS-PAGE e membrana de Western-Blotting que nas condições estudadas (37° C, 0,5 mM IPTG) as lisozimas foram encontradas em maior concentração na fração insolúvel dos extratos bacterianos induzidos.

As proteínas relativas às ORFs CLIBASIA_04790 (pMD15) e ED07_RS0204515 (pMD17) provenientes dos isolados Las 4PA e 3PA, respectivamente, quando induzidas em culturas de *E. coli* BL21 (DE3) com IPTG, cessaram o crescimento destas culturas, um fenótipo condizente com atividade de lisozima.

A forma de menor massa molecular (12 kDa, ED07_RS0204515 no plasmídeo pMD17) teve efeito mais pronunciado na estagnação de crescimento do que a forma de maior massa molecular (20 kDa, CLIBASIA_04790 no plasmídeo pMD15). Ambas as proteínas foram visualizadas em análises de SDS-PAGE e de Western-blotting (anticorpo contra His 6X), em maior concentração na fração insolúvel dos extratos proteicos.

A proteína referente à ORF SC1_gp060, proveniente do isolado Las Poona (plasmídeo pMD16), quando induzida em culturas de *E. coli* BL21 (DE3) com IPTG cessou o crescimento destas culturas, um fenótipo condizente com atividade de bacteriocina.

As bacteriocinas do tipo colicina Ia de Las apresentam heterogeneidade de sequência.

Os resultados aqui mostrados permitem uma conclusão preliminar de que colicinas ou lisozimas de Las podem conferir uma vantagem adaptativa em relação à Lam pela sua atividade direta em afetar o crescimento bacteriano.

6. PERSPECTIVAS

O sequenciamento massivo de nova geração de amostras de metagenomas possibilitou o sequenciamento dos genomas de Las (DUAN et al., 2009), Lam (WULFF et al., 2014) e Laf (LIN et al., 2015). Para bactérias associadas a doenças de plantas, como no caso destas liberibactérias, a disponibilidade do genoma é um marco para melhor compreender a interação patógeno hospedeiro. Liberibactérias são rizobactérias relacionadas a *Rhizobium* spp. e *Agrobacterium* spp., bactérias com íntima relação com hospedeiros eucarióticos. O acúmulo destas informações estimulou estudos funcionais para determinar o papel dos genes de *Liberibacter* na interação com seus hospedeiros.

O genoma das liberibactérias não evidenciou os tradicionais sistemas de virulência encontrados em bactérias fitopatogênicas (DUAN et al., 2009; ZHANG et al., 2011; LIN et al., 2011; LEONARD et al., 2012; WULFF et al., 2014; LIN et al., 2015), mas sim um elevado número de genes hipotéticos, os quais quando desvendados a sua função, podem revelar processos chave na interação com seus hospedeiros. Las codifica uma hidrolase de ATP (*nttA*) com capacidade de internalizar ATP em *E. coli*, levantando a hipótese de que as células de Las possam importar ATP a partir de seus hospedeiros (VAHLING; DUAN; LIN, 2010). Las possui uma flagelina contendo um domínio conservado de 22 aa (flg22) capaz de induzir morte celular e acúmulo de calose, atuando como um PAMP (ZOU et al., 2012). A translocação de zinco é outra habilidade de proteínas de Las, demonstrada em experimentos de complementação heteróloga (VAHLING-ARMSTRONG et al., 2012).

A descoberta e a caracterização de *Liberibacter crescens*, a única *Liberibacter* capaz de crescimento em cultura axênica (FAGEN et al., 2014) e com genoma completamente sequenciado (LEONARD et al., 2012), representa uma poderosa aliada em estudos funcionais. Lai et al. (2016) identificou genes com potencial envolvimento na culturabilidade de *L. crescens*, enquanto Fleites et al. (2014) e Jain et al. (2015) empregaram *L. crescens* para caracterizar genes relacionados aos profagos de Las com atividade de peroxidase, holina e lisozima. A atividade das peroxidases está relacionada a supressão de respostas de defesa da planta (JAIN et al., 2015), enquanto proteínas com atividade de lisozima e holina podem estar envolvidas na ativação do ciclo lisogênico dos profagos de Las (FLEITES et al., 2014).

Adicionalmente, Las codifica uma hidroxilase de salicilato, que tem capacidade de degradar o ácido salicílico (AS), um hormônio vegetal envolvido na sinalização de reconhecimento de patógenos e ativação de respostas de defesa (LI et al., 2017). Assim, Las produz peroxidase e AS hidroxilase que atuam para evitar as respostas de defesa do hospedeiro vegetal.

Apesar das dificuldades relacionadas a indisponibilidade das Liberibactérias fitopatogênicas em meio de cultura exênico, os diversos estudos até o momento apresentados se configuram como evidências de que mais informações podem ser desvendadas através de estudos heterólogos, o que pode levar a criação de ferramenta biotecnológicas para o controle das doenças causadas por estas bactérias.

6.1.Utilização de lisozimas e bacteriocinas no controle de doenças em plantas

As lisozimas são classificadas em diferentes famílias, com ampla dissimilaridade em sequência, mas semelhança na estrutura secundária, sendo as principais relacionadas à lisozima da clara de ovo (do tipo C e G), e a de vírus de bactérias (V) (JESPERS; SONVEAUX; FASTREZS, 1990). Com base na localização dos resíduos catalíticos da porção C-terminal, e nos modos de ligação ao substrato, tem-se a hipótese de que as lisozimas possuem um ancestral comum (EVRARD; FASTREZ; DECLERCQ, 1998). A transglicosilase da *E. coli* (Slt70) de 70 kDa, possui resíduo catalítico muito semelhante ao encontrado na lisozima do bacteriófago T4, que por sua vez mostrou similaridades com a quitosanase N174 de *Streptomyces* sp. Adicionalmente a lisozimas de T4, P22 e do fago λ (lambda) são facilmente alinhadas (EVRARD; FASTREZ; DECLERCQ, 1998). As lisozimas são utilizadas por bacteriófagos para facilitar sua infecção através da digestão limitada das ligações peptídicas da parede celular bacteriana (FASTREZS, 1996) sendo que duas estratégias são utilizadas para a liberação de vírions. A principal é aquela onde, em fagos maiores como T4 e λ , há o uso de um operon que usualmente codifica uma lisozima e uma holina, esta última responsável por facilitar o acesso da lisozima à parede celular bacteriana (JESPERS; SONVEAUX; FASTREZS, 1990; FASTREZS, 1996).

Bacteriocinas por sua vez, são peptídeos ou proteínas antimicrobianos que podem tanto matar ou inibir o crescimento de cepas relacionadas (YANG, et al. 2014). Existem diversos tipos de bacteriocinas, e o mecanismo geral de ação envolve o reconhecimento da toxina pelo receptor, a translocação através da membrana e a ativação no compartimento celular de destino (ZETH, 2012) por três domínios em comum geralmente compartilhados, sendo de translocação (T), receptor ligante (R) e domínio de atividade (A). As colicinas são as principais bacteriocinas das bactérias Gram-negativas (KLEANTHOUS, 2010). Elas geralmente possuem entre 30 e 100 kDa e estão presentes em um operon contendo também uma proteína de imunidade no sentido de prevenir auto-destruição das células produtoras (KLEANTHOUS, 2010). Quanto ao mecanismo de ação, as colicinas podem tanto formar poros na membrana interna, levando a morte celular por extravasamento, quanto digerir DNA ou RNA e também um precursor do peptídeoglicano (YANG et al., 2014).

Existem trabalhos na literatura que empregaram tanto lisozimas relacionadas à profagos quanto bacteriocinas no controle de bactérias fitopatógenas, que mostraram que plantas de pereira e batateira transgênicas expressando a lisozima do bacteriófago T4 apresentaram resistência a *Erwinia carotovora* e a *Erwinia amylovora* (DÜRING et al., 1993; KO et al., 2002) e que houve cerca de 80% de remissão de sintomas da doença causada por *Pseudomonas syringae subsp. savastanoi* em oliveiras, quando tratadas com bacteriocinas (LAVERMICOCCA et al., 2002).

Empregar genes com potencial antibacteriano e direcionar sua expressão ao floema da planta cítrica ou em outra instância usar genes que regulem o ciclo lítico dos profagos para matar a bactéria através de lise é o tema de uma linha de pesquisa em desenvolvimento no Fundecitrus. A melhor caracterização destes alvos em pesquisas com bactérias em sistemas heterólogos é o objetivo para selecionar alvos a serem usados em transformação genética de laranja doce. A demora neste processo requer o uso de alvos com caracterização funcional, em oposição ao uso com base em predição puramente teórica. As colicinas e as lisozimas de Las como as caracterizadas neste trabalho e por Fleites et al. (2014), evidenciam a possível variabilidade em tamanho das proteínas e atividade biológica, assim como indicam evidências de atividade relacionada a bacteriocinas.

Com bases no tema e evidências aqui discutidas, produtos gênicos com capacidade de controlar o crescimento de Las como estes genes, podem ser alvos

para estratégias biotecnológicas e são passíveis de utilização na produção de plantas transgênicas para o controle do huanglongbing.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOR, D. S.; ETXEBERRIA, E.; WANG, N.; FOLIMONOVA, S. Y.; CHUNG, K. R.; ALBRIGO, L.G. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. **Plant Pathology Journal**. v. 9, n. 2, p. 56-64, 2010.
- ALDERTON, G., WARD, W. H.; FEVOLD, H. L. Isolation of lysozyme from egg white. **J. biol. Chem.**, v. 157, n. 43, 1945.
- AMMAR, E. D.; RICHARDSON, M. L.; ABDO, Z.; HALL, D. G.; SHATTERS-JR, R. G. Differences in stylet sheath occurrence and the fibrous ring (sclerenchyma) between *xCitroncirus* plants relatively resistant or susceptible to adults of the asian citrus psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). **PLoS One**, v. 9, n.10, 2014.
- ANDERSSON, S. G.; KURLAND, C. G. Reductive evolution of resident genomes. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 263-268, 1998.
- ARUTYUNOV, D.; FROST, L.S. F conjugation: back to the beginning. **Plasmid**, v. 70, p. 18–32, 2013.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology**, v. 10, p. 411-421, 1999.
- BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L.H.; BUSATO, L. A.; STUCHI, E. S. Damages caused by Huanglongbing in sweet orange yield and quality in São Paulo. In: **Proceedings of the Huanglongbing - Greening International Workshop**. Ribeirão Preto –SP, p. 39, 2006.
- BASSANEZI, R. B.; MONTESINO, L. H.; GIMENES-FERNANDES, N.; YAMAMOTO, P. T.; GOTTWALD, T. R.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Efficacy of area-wide inoculum reduction and vector control on temporal progress of huanglongbing in young sweet orange plantings. **Plant Disease**, v. 97, p.789-796, 2013.
- BEHLAU, F.; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; BARBOSA, J. C.; SALA, I.; TROMBIN, V. G. Levantamento de Doenças dos Citros: HLB, CVC e Cancro Cítrico. **Fundo de Defesa da Citricultura**, Araraquara, SP: Fundecitrus, 2017. 56 p.
- BELASQUE, J. J.; BASSANEZI, R. B.; YAMAMOTO, P. T.; AYRES, A. J.; TACHIBANA, A.; VIOLANTE A. R.; TANK, J. A.; DI GIORGI, F.; TERSI, F. E. A.; MENEZES, G. M.; DRAGONE, J.; JANK, J. R. H.; BOVÉ, J. M. Lessons from Huanglongbing management in São Paulo state, Brazil. **J. Plant Pathology**, v. 92, n. 2, p. 285-302, 2010.

BELASQUE-JUNIOR, J.; BERGAMIM-FILHO, A.; BASSANEZI, R. B.; BARBOSA, J.C.; FERNANDES, N. G.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; MACHADO, M. A.; LEITE-JUNIOR, R. P.; AYRES, A. J.; MASSARI, C. A. Base científica para a erradicação de plantas sintomáticas e assintomáticas de Huanglongbing (HLB, Greening) visando o controle efetivo da doença. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.3, p.137-145, 2009.

BOVÉ, Joseph Marie. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **J. Plant Pathology**, Bordeaux, v. 88, n. 1, p.7-37, 2006.

BRUSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 3, p. 560–602, 2004.

BUNNIK, E. M.; LE ROCH, K. G. An Introduction to functional genomics and systems biology. **Advances in Wound Care**, v. 2, n. 9, p. 490 – 498, 2012.

CAPOOR, S. P.; RAO, D. G.; VISWANATH, S. M. *Diaphorina citri* Kuwayma, a vector of the greening disease of citrus in India. **Indian Journal of Agricultural Science**, v. 37, p. 572-576, 1967.

CHAPELLE, M.; GIRARD, P. A.; COUSSERANS, F.; VOLKOFF, N. A.; DUVIC, B. Lysozymes and lysozyme-like proteins from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Molecular Immunology**, n. 47, p. 261–269, 2009.

CHAO, L.; LEVIN, B. R. Structured habitats and the evolution of anticompertitor toxins in bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 78, p. 6324–6328, 1981.

CHAVAN, M.; RILEY, M. Molecular evolution of bacteriocins in Gram-negative bacteria. In *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. **Springer**, p. 19-43, 2007.

CITRUSBR. O setor citrícola brasileiro. Disponível em<http://www.citrusbr.com/loranjapatrimonio/imgs/Citrus_Institucional_Setor_Citricola_Brasileiro_versao2_vale.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2018

CITRUSBR. Citricultura impulsiona vagas de empregos no interior de SP. 2017. Disponível em:<<http://www.citrusbr.com/destaques/?id=312454>>. Acesso: 27 jan. 2018

COLETTA-FILHO H. D.; TARGON M. L. P. N.; TAKITA M. A.; DE NEGRI J. D.; POMPEU J. J.; MACHADO M. A. First report of the causal agent of huanglongbing (“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”) in Brazil. **Plant Disease**, v.88, p. 1382, 2004.

CRAMER, W. A.; HEYMANN, J. B.; SCHENDEL, S. L.; DERIY, B. N.; COHEN, F. S.; ELKINS, P. A.; STAUFFACHER, C. V. Structure-function of the channel-forming colicins. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, n. 1, p.611-641, 1995.

DE FEYTER, R.; GABRIEL, D. W. Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 6421–6427, 1991.

DUAN, Y.; ZHOU, L.; HALL, D. G.; LI, W.; DODDAPANENI, H.; LIN, H.; LIU, L.; VAHLING, C. M.; GABRIEL, D. G.; WILLIAMS K. P.; DICKERMAN, A.; SUN, Y.; GOTTWALD, T. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, 'Candidatus Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 22, n. 8, p.1011-1020, 2009.

DÜRING, K.; PORSCHE, P.; FLADUNG, M.; LÖRZ, H. Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. **The Plant Journal**, v. 3, n. 4, p. 587-598, 1993.

EVARD, C.; FASTREZS, J.; DECLERCQ, J. Crystal structure of the lysozyme from bacteriophage lambda and its relationship with V and C-type lysozymes. **J. Mol. Biol.**, v. 276, p. 151-164, 1998.

FAGEN, J. R.; LEONARD, M. T.; COYLE, J. F. MCCULLOUGH, C. M.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; DAVIS, M. J.; TRIPLETT, E. W. *Liberibacter crescens* gen. nov., sp. nov., the first cultured member of the genus *Liberibacter*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 64, p. 2461–2466, 2014.

FANCELLI, M.; BORGES, M.; LAUMANN, R. A.; PICKETT, J. A.; BIRKETT, M. A.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. Attractiveness of host plant volatile extracts to the asian citrus psyllid, *Diurapha citri*, is reduced by terpenoids from the non-host cashew. **J Chem Ecol.**, v. 44, n. 4, p. 397–405, 2018.

FASTREZS, J. Phage lysozymes. Lysozymes: **Model Enzymes in Biochemistry and Biology**, Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology. - 1996 Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology / ed. By P. Jollés.-Basel; Boston; Berlin: Birkhäuser, 1996

FLEITES, L. A.; JAIN, M.; ZHANG, S.; GABRIEL, D. W.; "Candidatus Liberibacter asiaticus" prophage late genes may limit host range and culturability. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, n. 19, 2014.

FLEMING, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proc. Roy. Soc. B.**, v. 93, n. 653, 1922.

FOLIMONOVA, S. Y.; ROBERTSON, C. J.; GARNSEY, S. M.; GOWDA, S.; DAWSON, W. O. Examination of the responses of different genotypes of citrus to Huanglongbing (citrus greening) under different conditions. **Phytopathology**, v. 99, p. 1346-1354, 2009.

FORTIER, LOUIS-CHARLES; SEKULOVIC, OGNJEN. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. **Virulence**, v.4, n. 5, p. 354–365; 2013;

FROST, L. S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A. O.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, n. 9, p. 722–32, 2005.

FUNDECITRUS - Fundo de Defesa da Citricultura. Manual Técnico. Greening. Julho 2009. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/manuaistecnicos/fundecitrus_greening.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2018

GARNIER, M.; DANIEL, N.; BOVÉ, J. M. **The greening disease organism is a Gram negative bacterium.** In: Proc. 9th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol., IOCV, Riverside – CA., p. 115-124, 1984.

GARNIER, M.; JAGOUÉIX-EVEILLARD, S.; CRONJE, P. R.; LE ROUX, H. F.; BOVÉ, J. M. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa. Proposal of ‘*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*’. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 2119–2125, 2000a.

GARNIER, M.; BOVÉ J. M.; CRONJE, C. P. R.; SANDERS, G. M.; KORSTEN, L.; LEROUX, H. F. Presence of “*Candidatus Liberibacter africanus*” in the Western Cape province of South Africa.” **Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virol.**, 14th, Campinas, São Paulo, Sept. 13 –18, 1998, p. 369–72. Riverside, CA: IOCV, 2000b.

GHOUL, M.; MITRI, S. The ecology and evolution of microbial competition. **Trends in Microbiology**, v. xx, n. yy, 2016.

GOTTWALD, T, R.; GRAÇA, J. V.; BASSANEZI, R. B. Citrus Huanglongbing: The pathogen and Its Impact. **Plant Health Progress**, 2007.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial Secretion Systems – An overview. **Microbiol Spectr.**, v. 4, n. 1, 2016.

GRINTER, R.; MILNER, J. WALKER, D. Bacteriocins active against plant pathogenic bacteria. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 6, p. 1498-1502, 2012.

HANSEN, A. K.; TRUMBLE, J. T.; STOUTHAMER, R.; PAINE, T. D. A new Huanglongbing species, “*Candidatus Liberibacter psyllaeus*,” found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 74, n.18, p. 5862–5865, 2008.

HAO, G.; PITINO, M.; DING, F.; LIN, H.; STOVER, E.; DUAN, Y. Induction of innate immune responses by flagellin from the intracellular bacterium, ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’. **BMC Plant Biol.**, v. 14, n. 211, 2014.

HAVARSTEIN, L.S.; HOLO, H.; NES, I. F. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **Microbiology**, v. 140, p. 2383-2389, 1994.

HEIJNE, Gunnar Von. The signal peptide. topical review. **J. Membrane Biol.** v.115, p.195-201, 1990.

HIBBING, M. E.; FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.8, n.1, p.15–25, 2010.

HILDEBRAND, P. W.; PREISSNER, R.; FRÖMMEL, C. Structural features of transmembrane hélices. **FEBS Letters**, v. 559, p. 145-151, 2004.

HOSPENTHAL, M. K.; COSTA, T. R. D.; WARKSMAN, G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 365-379, 2017.

HOWARD, S. P.; LINDSAY, L. In Vivo analysis of sequence requirements for processing and degradation of the colicin a lysis protein signal peptide. **J. of Bacteriology**, v. 180, n. 12, p. 3026–3030, 1998.

HUECK, Christoph J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, p. 379–433, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Levant. Sistem. Prod. Agríc.** Rio de Janeiro, v. 30, n.1, p. 01-81, Janeiro 2017.

ISLAM, M.; GLYNN, J. M.; BAI, Y.; DUAN, Y. P.; COLETTA-FILHO, H. D.; KURUBA, G.; CIVEROLO, E. L.; LIN, H. Multilocus microsatellite analysis of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing worldwide. **BMC Microbiol.**, v. 12, n. 39, 2012.

JAGOEIX, S.; BOVÉ, J.-M.; GARNIER, M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 379–386, 1994.

JAIN, M.; FLEITES, L. A.; GABRIEL, D. W. Prophage-encoded peroxidase in '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is a secreted effector that suppresses plant defenses. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 28, p. 1330–1337, 2015.

JAIN, M.; MUNOZ-BODNAR, A.; ZHANG, S.; GABRIEL, D. W. A secreted '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' peroxiredoxin simultaneously suppresses both localized and systemic innate immune responses in planta. **Molecular Plant-Microbe Interactions** "First Look" paper, v. 31, 2018.

JESPERS, L.; SONVEAUX, E.; FASTREZS, J. Is the bacteriophage lambda lysozyme an evolutionary link or a hybrid between the c and v-type lysozymes? Homology analysis and detection of the catalytic amino acid residues. **J. Mol. Biol.**, v. 228, p. 529-538, 1990.

JOLLÈS, P.; JOLLÈS, J. What's new in lysozyme research? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 63, p. 165-189, 1984.

JOO, J.; GUNNY, M.; CASES, M.; HUDSON, P.; ALBERT, R.; HARVILL, E. Bacteriophage-mediated competition in *Bordetella* bacteria. **Proc. R. Soc. B.**, v. 273, p. 1843–1848, 2006.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

JUNN, H. J.; YOUN, J.; SUH, K. H.; LEE, S. S. Cloning and expression of *Klebsiella* phage K11 lysozyme gene. **Protein Expression and Purification**, v. 42, p. 78–84, 2005.

KANO, S.; MASAKI, H.; YAJIMA, S.; OHTA, T.; UOZUMI, T. Signal peptide of the colicin E2 lysis protein causes host cell death. **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, n. 6, p. 1607–1614, 1991.

KIDAMBI, S. P.; RIPP, S.; MILLER, R. V. Evidence for phage-mediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosa* strains on the phylloplane. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 2, p. 496–500, 1994.

KIENKER, P. K.; QIU, X. Q.; SLATIN, S. L.; FINKELSTEIN, A.; JAKES, K. S. Transmembrane insertion of the Colicin Ia hydrophobic hairpin. **J. Membrane Biology**, v. 157, n. 1, p. 27–37, 1997.

KIM, W.; SALM, H.; GEIDER, K. Expression of bacteriophage wEa1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. **Microbiology**, v.150, p. 2707–2714, 2004.

KIM, W.; RACIMO, F.; SCHLUTER, J.; LEVY, S. B.; FOSTER, K. R. Importance of positioning for microbial evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 111, n. 6, p. 1639–1647, 2014.

KLEANTHOUS, C.; KÜHLMANN, U. C.; POMMER, A. J.; FERGUSON, N.; RADFORD, S. E.; MOORE, G. R.; JAMES, R.; HEMMINGS, A. M. Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. **Nature Structural Biology [s.l.]**, v. 6, n. 3, p.243–252, 1999.

KLEANTHOUS, COLIN. Swimming against the tide: progress and challenges in our understanding of colicin translocation. **Nature Reviews Microbiology [s.l.]**, v. 8, n. 12, p. 843–848, 2010.

KO, K.; NORELLI, J. L.; REYNOIRD, J.; ALDWINCKLE, H. S.; BROWN, S. K. T4 Lysozyme and attacin genes enhance resistance of transgenic 'Galaxy' apple against *Erwinia amylovora*. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, v. 127, n. 4, p. 515–519, 2002.

KOIDE, T.; ZAINI, P. A.; MOREIRA, L. M.; VENCIO, R. Z. N.; MATSUKUMA, A. Y.; DURHAM, A. M.; TEIXEIRA, D. C.; EL-DORRY, H.; MONTEIRO, P. B.; SILVA, A. C. R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; SILVA, A. M.; GOMES, S. L. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 16, p. 5442–5449, 2004.

KOMMINENI, S.; BRETL, D. J.; LAM, V.; CHAKRABORTY, R.; HAYWARD, M.; SIMPSON, P.; CAO, Y.; BOUSOUNIS, P.; KRISTICH, C. J.; SALZMAN, N. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. **Nature**, v. 526, n. 7575, p.719-722, 2015.

LAFLECHE, D.; BOVÉ, J. M. Structures de type mycoplasma dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. **CR Acad. Sci. Paris**, v.270, p. 1915-1917, 1970.

KORONAKIS, V.; ESWARAN, J.; HUGHES, C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. **Annu Rev Biochem.**, v.73, p. 467-489, 2004.

LAI, K. K.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; DIAS, R.; TRIPLETT, E. W. Identification of the genes required for the culture of *Liberibacter crescens*, the closest cultured relative of the liberibacter plant pathogens. **Plant Pathogens, Front. Microbiol.**, v. 7, n. 547, 2016.

LAVERMICOCCA, P.; LONIGRO1, S. L.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; VISCONTI, A. Reduction of olive knot disease by a bacteriocin from *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 3, p. 1403-1407, 2002.

LAVIGNE, R.; BRIERS, Y. HERTVELDT, K.; ROBBENB, J.; VOLCKAERT, G. Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 2753–2759, 2004.

LEE, C. N.; LIN, J. W.; CHOW, T. Y.; TSENG, Y. H.; WENG, S. F. A novel lysozyme from *Xanthomonas oryzae* phage Xo411 active against *Xanthomonas* and *Stenotrophomonas*. **Protein Expression and Purification**, n. 50, p. 229–237, 2006.

LEONARD, M. T.; FAGEN, J. R.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; DAVIS, M. J.; TRIPLETT, E. W. Complete genome sequence of *Liberibacter crescens* BT-1. **Standards in Genomic Sciences**, v. 7, p. 271-283, 2012.

LEON-SICAIROS, N.; REYES-CORTES, R.; GUADRÓN-LLANOS, A. M.; MADUEÑA-MOLINA, J.; LEON-SICAIROS, C.; CANIZALEZ-ROMÁN, A. Strategies of intracellular pathogens for obtaining iron from the environment. **BioMed Research International**, 17 p., 2015.

LI, W.; HARTUNG, J. S.; LEVY, L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. **J. Microbiological Methods**, v. 66, p. 104–115, 2006.

LI, J.; PANG, Z.; TRIVEDI, P.; ZHOU, X.; YING, X.; JIA, H.; WANG, N. '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' encodes a functional salicylic acid (SA) hydroxylase that degrades sa to suppress plant defenses. **Mol Plant Microbe Interact.**, v. 30, n. 8, p. 620-630, 2017

LIEFTING, L. W.; WEIR, B. S.; PENNYCOOK, S. R.; CLOVER, G. R. G. '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', associated with plants in the family Solanaceae. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 59, p. 2274–2276, 2009.

LIN, K. H. Observations on yellow shoot on citrus. Etiological studies of yellow shoot of citrus. **Acta Phytopathol.**, v. 2, n. 1, p. 1-42, 1956.

LIN, H.; LOU, B.; GLYNN, J. M.; HDODDAPANENI, H.; CIVEROLO, E. L.; CHEN, C.; DUAN, Y. ZHOU, L.; VAHLING, M. C. The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', the bacterium associated with potato zebra chip disease. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

LIN, H.; D. COLETTA-FILHO, H. D.; HAN, C. S.; LOU, B.; CIVEROLO, E. L.; MACHADO, M. A.; GUPTAC, G Draft genome sequence of "*Candidatus Liberibacter americanus*" bacterium associated with citrus Huanglongbing in Brazil. **Genome Announc.**, v. 1, n. 3, 2013.

LIN, H.; PIETERSEN, G.; HAN, C.; READ, D. A.; LOU, B. GUPTA, G.; CIVEROLO, E. L. Complete genome sequence of "*Candidatus Liberibacter africanus*," a bacterium associated with citrus huanglongbing. **Genome Announc.**, v. 3, n. 4, 2015.

LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B. **A doença do Huanglongbing dos citros no Estado de São Paulo.** In: Manejo Integrado de doenças em fruteiras. Núcleo de estudos em Fitopatologia, Viçosa: UFV. Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 257-258, 2007

LOPES, S. A.; FRARE, G. F.; BERTOLINI, E; CAMBRA, M.; FERNANDES, N. G.; AYRES, A. J.; MARIN, D. R.; BOVÉ, J. M. Liberibacters associated with citrus Huanglongbing in Brazil: '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' is heat tolerante, '*Candidatus Liberibacter americanus*' is heat sensitive. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 93, p. 257-262, 2009a.

LOPES, S. A.; BERTOLINI, E.; FRARE, G. F.; MARTINS, E.; WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; FERNANDES, N. G.; CAMBRA, M. Graft transmission efficiencies and multiplication of '*Candidatus Liberibacter americanos*' and '*Ca. Liberibacter asiaticus*' in citrus plants. **Phytopatology**, v. 99, n. 3, p. 301-306, 2009b.

LUIRINK, J.; WATANABE, T; WU, H. C.; STEGEHUIS, F.; DE GRAAF, F.; OUDEGA, B. Modification, processing, and subcellular localization in *Escherichia coli* of the pCloDF13-encoded bacteriocin release protein fused to the mature portion of r-lactamase. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 5, p. 2245-2250, 1987.

MA, J.; CAMPBELL, A. & KARLIN, S. Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures. **J Bacteriol.**, v. 184, n. 20, p. 5733–5745, 2002.

MACHADO, M. A.; LOCALI-FABRIS, E. C.; COLETTA-FILHO, H. D. *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do *huanglongbing* dos citros. **Citrus Research & Technology**, Cordeirópolis, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2010.

MANKOVICH, J. A.; HSU, C. H.; KONISKY, J. DNA and amino acid sequence analysis of structural and immunity genes of colicins Ia and Ib. **J. Bacteriol.**, v. 168, n. 1, p. 228-236, 1986.

MARTOGLIO, B.; DOBBERSTEIN, B. Signal sequences: more than just greasy peptides. **Trends in CELL BIOLOGY**, v 8, 1998.

MURRAY, R. G. E.; SCHLEIFER, K. H. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.44, p.174-176, 1994.

NARDI, A.; CORDA, Y.; DUCHÉ, D. Colicin A immunity protein interacts with the hydrophobic helical hairpin of the colicin a channel domain in the escherichia coli inner membrane. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 22, p. 6721-6725, 2001.

NEVES, M. F.; TROMBIN, N. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O Retrato da Citricultura brasileira**. São Paulo: CitrusBR, 2010. 138p

NEVES, M. F.; TROMBIN, N. G. **Anuário da Citricultura 2017**. São Paulo: CitrusBR, 2017, 57p.

PANICKER, I. S.; BROWNING, G. F.; MARKHAM, F. P. The effect of an alternate start codon on heterologous expression of a phoA fusion protein in *Mycoplasma gallisepticum*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015.

PARRET, A. H. A.; DE MOT, R. Bacteria killing their own kind: novel bacteriocins of Pseudomonas and other γ -proteobacteria. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 107–112, 2002.

PAULILLO, L. F. **Agroindústria e citricultura no Brasil: diferenças de dominâncias**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006. 482p.

PAULINO, E. T.; FABRINI, J. E. (Org.). **Campesinato de territórios em disputa**. São Paulo: Expressão Popular, 2008. 471 p.

PEROTTONI, C. **Clonagem e expressão de proteína heteróloga com potencial imunogênico contra *Corynebacterium diphtheriae* kruse, 1886**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

POTEETE, A. R.; HARDY, L. W. Genetic analysis of bacteriophage T4 lysozyme structure and function. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 22, p. 6783-6788, 1994.

PRYOR, K. D.; LEITING, B. High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a his₆-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. **Protein Expression and Purification**, v. 10, p. 309–319, 1997.

RADDADI, N.; GONELLA, E.; CAMEROTA, C.; PIZZINAT, A.; TEDESCHI, R.; CROTTI, E.; MANDRIOLI, M.; BIANCO, P. A.; DAFFONCHIO, D.; ALMA, A. “*Candidatus Liberibacter europaeus*” sp. nov. that is associated with and transmitted by the psyllid *Cacopsylla pyri* apparently behaves as an endophyte rather than a pathogen. **Environ. Microbiol.**, v. 13, n. 2, p. 414–426, 2011.

RAMSEY, J. S.; CHAVEZ, J. D.; JOHNSON, R.; HOSSEINZADEH, S.; MAHONEY, J.E.; MOHR, J.P.; ROBINSON, F.; ZHONG, X.; HALL, D. G.; MACCOSS, M.; BRUCE, J.; CILIA, M. Protein interaction networks at the host–microbe interface in *Diaphorina citri*, the insect vector of the citrus greening pathogen. **Royal Society Open Science**, v. 2, n. 4, 2017.

RILEY, M. A. Molecular mechanisms of colicin evolution. **Mol Biol Evol.**, v. 10, n. 6, p. 1380-1395, 1993.

SALTON, M. R. J. The lysis of micro-organisms by lysozyme and related enzymes. **J. gen. Microbiol.**, v.18, p. 481-490, 1958.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E. F.; T. MANIATIS, T. Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SCHUBERT, P.; KRUGER, N.; STEINBUCHER, A. Molecular analysis of the *alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 1, p. 168-175, 1991.

SCHULZ, S.; STEPHAN, A.; HAHNA, S.; BORTESIA, L.; JARCZOWSKI, F.; BETTMANN, U.; PASCHKE, A. K.; TUSÉ, D.; STAHL, C. H.; GIRITCH, A. GLEBA, Y. Broad and efficient control of major foodborne pathogenic strains of *Escherichia coli* by mixtures of plant-produced colicins. **PNAS**, v. 112, n. 40, 2015.

SINGH, A.; UPADHYAY, V.; UPADHYAY, A. K.; SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 41, 2015.

SOUTOURINA, O. A.; BERTIN, P. N. Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 505-523, 2003.

SOUZA, D. P.; OKA, G. U.; ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; BISSON-FILHO, A. W.; DUNGER, G.; HOBEIKA, L. CAVALCANTE, N. S.; ALEGRIA, M. C.; BARBOSA, L. R. S.; SALINAS, R. K.; GUZZO, C. R.; FARAH, C. S. Bacterial killing via a type IV secretion system. **Nature Communications**, v. 6, n. 6453, 2015.

STUBBENDIECK, R. M.; VARGAS-BAUTISTA, C.; STRAIGHT, PD. Bacterial communities: interactions to scale. **Front. Microbiol.**, v. 7, 2016a.

STUBBENDIECK, R. M.; STRAIGHT, P. D. Multifaceted Interfaces of Bacterial Competition. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 16, 2016b.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; COSTA, P. I.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. "*Candidatus Liberibacter americanus*", associated with citrus huanglongbing (greening disease) in Sao Paulo State, Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1857–1862, 2005.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A. J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M. A phytoplasma closely related to the pigeon pea witches'-broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with citrus huanglongbing symptoms in the state of Sao Paulo, Brazil. **Phytopathology**, v. 98, p. 977-984, 2008.

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; LOPES, S. A.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; SPÓSITO, M. B.; BELASQUE Jr. J.; BASSANEZI, R. B. Caracterização e etiologia das bactérias associadas ao Huanglongbing dos citros. **Citrus Research & Technology**, v. 31, n. 2, p. 115-128, 2010.

THANASSI, D. G.; BLISKA, J. B.; CHRISTIE, P. J. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, p.1046–1082, 2012.

THOMPSON, S.; FLETCHER, J. D.; ZIEBELL, H.; BEARD, S.; PANDA, P.; JORGENSEN, N.; FOWLER, S. V.; LIEFTING, L. W.; BERRY, N.; PITMAN, A.R. First report of '*Candidatus Liberibacter europaeus*' associated with psyllid infested Scotch broom. **New Disease Reports**, v. 27, n. 6, 2013.

VAHLING, C. M.; DUAN, Y.; LIN, H. Characterization of an ATP Translocase Identified in the Destructive Plant Pathogen "*Candidatus Liberibacter asiaticus*". **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 3, p. 834–840, 2010.

VAHLING-ARMSTRONG, C.M.; ZHOU, H.; BENYON, L.; MORGAN, J. K.; DUAN, Y. Two plant bacteria, *S. meliloti* and *Ca. Liberibacter asiaticus*, share functional *znuABC* homologues that encode for a high affinity zinc uptake system. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

VAN GERVEN, N.; KLEIN, R. D.; HULTGREN, S. J; REMAUT, H. Bacterial amyloid formation: structural insights into curli biogenesis. **Trends Microbiol.**, v. 23, p. 693–706, 2015.

VARANI, A. M.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; NAKAYA, H. I.; SLUYS, M. A. V. The role of prophage in plant-pathogenic bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 51, p. 429-451, 2013.

VIDAVER, A. K.; MATHYS, M. L.; THOMAS, M. E.; SCHUSTER, M. L. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea*, and *P. phaseolicola*. **Can. J. Microbiol.**, v. 18, p. 705–713, 1972.

WANG, N.; PIERSON, E. A. SETUBAL, J. C. XU, J.; LEVY, J. G.; ZHANG, Y.; LI, J.; RANGEL, L. T.; MARTINS, J. Jr. The *Candidatus Liberibacter*-host interface: insights into pathogenesis mechanisms and disease control. **Annu Rev Phytopathol.**, v. 4, n. 55, p. 451-482, 2017.

WIENER, M.; FREYMAN, D.; GHOSH, P.; STROUD, R. M. Crystal structure of colicin Ia. **Nature [s.l.]**, v. 385, n. 6615, p. 461-464, 1997.

WOMMACK, K. E.; COLWELL, R. R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 1, p. 69–114, 2000.

WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; MARTINS, E. C.; PADIAR, N. R. H.; MARIANO, A. G.; CARMO, A. E.; ABRAHÃO, D. P.; SOUSA, M. C.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M. Huanglongbing diagnosis In: **Huanglongbing – Greening International Workshop, 2006, Ribeirão Preto**. Proceedings of the Huanglongbing – Greening International Workshop, 2006. p.17.

WULFF, N. A.; ZHANG, S.; SETUBAL, J. C.; ALMEIDA, N. F.; MARTINS, E. C.; HAKAKA, R.; KUMAR, D.; RANGEL, L. T.; FOISSAC, X.; BOVÉ, J. M.; GABRIEL, D. G. The complete genome sequence of '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with Citrus huanglongbing. **Mol Plant Microbe Interact.**, v. 2, n. 27, p.163-176, 2014.

WULFF, N. A.; TEIXEIRA, D. C.; Martins, E. C.; TOLOY, R. S.; BIANCO, L. F.; COLLETTI, D. A. B.; KITAJIMA, E. W.; BOVÉ, J. M. Sunn hemp, a major source-plant of the phytoplasma associated with huanglongbing symptoms of sweet orange in São Paulo State, Brazil. **Journal of Citrus Pathology**, v. 2, n. 1, 2015.

YANG, S.; LIN, C. H.; SUNG, C. T. FANG, J. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 241, 2014.

ZETH, K. Structure and uptake mechanism of bacteriocinas targeting peptidoglycan renewal. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, p. 1560 -1567, 2006.

ZHANG, Z.; HENZEL, W. J. Signal peptide prediction based on analysis of experimentally verified cleavage sites. **Protein Sci.**, v. 3, n. 10, p. 2819–2824, 2004.

ZHANG, S.; FLORES-CRUZ, Z.; ZHOU, L. KANG, B.; FLEITES, L. A.; GOOCH, M. D.; WULFF, N. A.; DAVIS, M. J.; Duan, Y.; GABRIEL, D. W. '*Ca. Liberibacter asiaticus*' carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections. **MPMI**, v. 24, n. 4, p. 458–468, 2011.

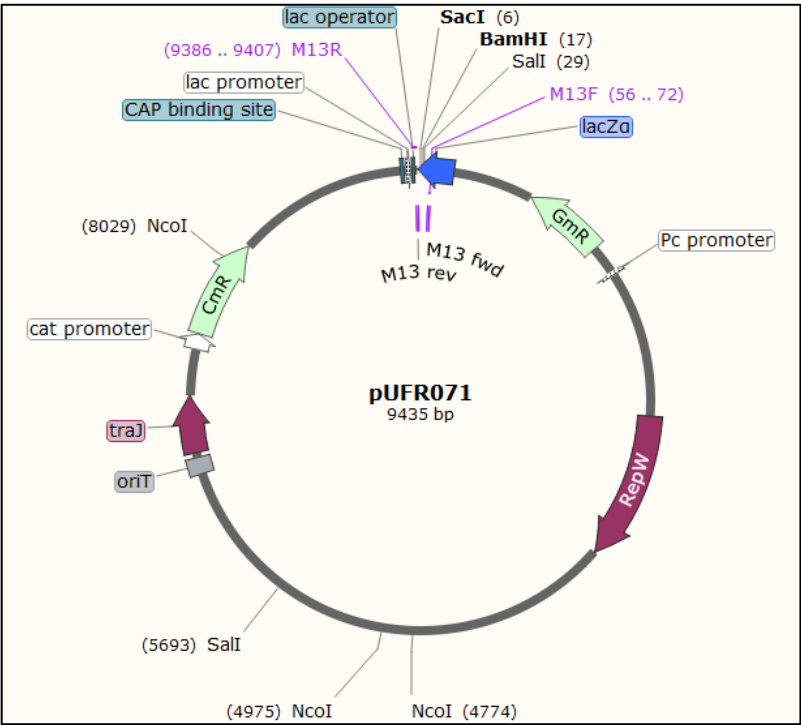
ZHENG, Z.; BAO, M.; WU, F.; CHEN, J.; DENG, X. Predominance of single prophage carrying a CRISPR/Cas system in "*Candidatus liberibacter asiaticus*" strains in southern China. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 2016.

ZHOU, L.; POWELL, C.A.; HOFFMAN, M. T.; LI, M.; FAN, G.; LIU, B.; LIN, H.; DUAN, Y. Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont *Candidatus Liberibacter asiaticus* as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p 6663–6673, 2011.

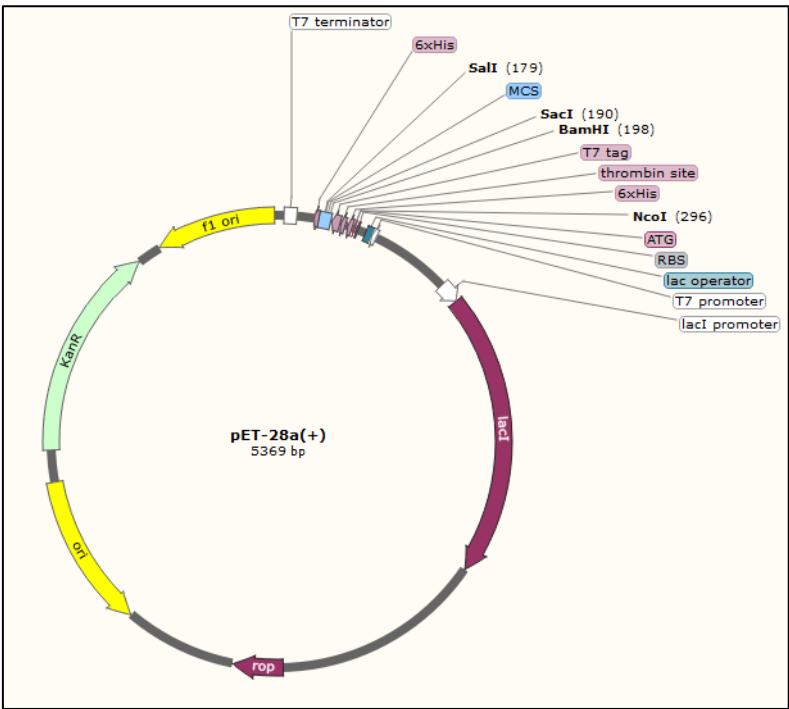
ZOU, H.; GOWDA, S.; ZHOU, L.; HAJERI, S.; CHEN, G.; DUAN, Y. The destructive citrus pathogen, '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' encodes a functional flagellin characteristic of a pathogen-associated molecular pattern. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Vetor pUFR071 (JAIN et al., 2015; DE FEYTER; GABRIEL, 1991)

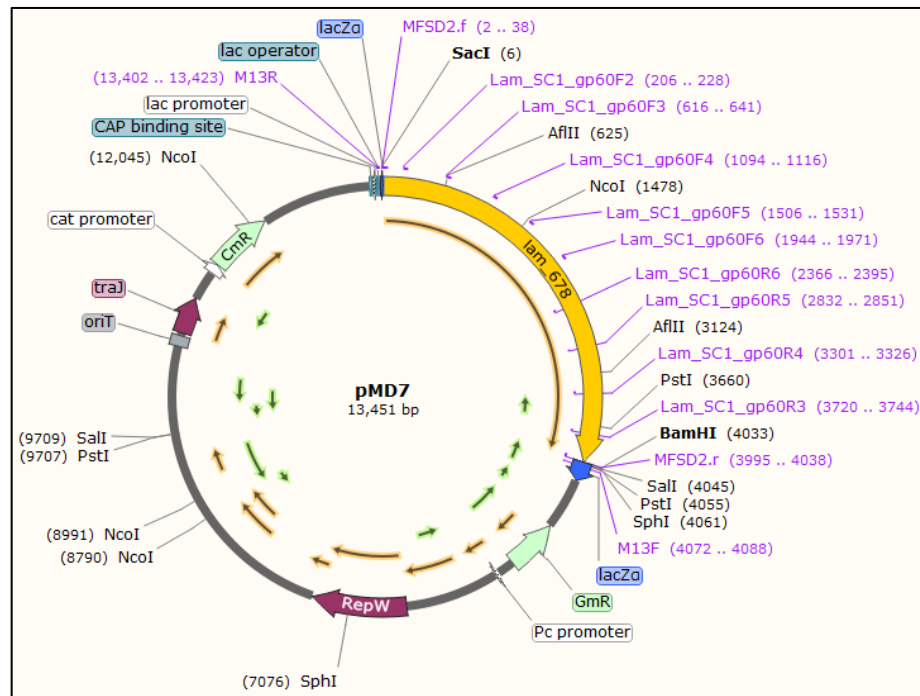


APÊNDICE B – Vetor pET28a (Novagen®)

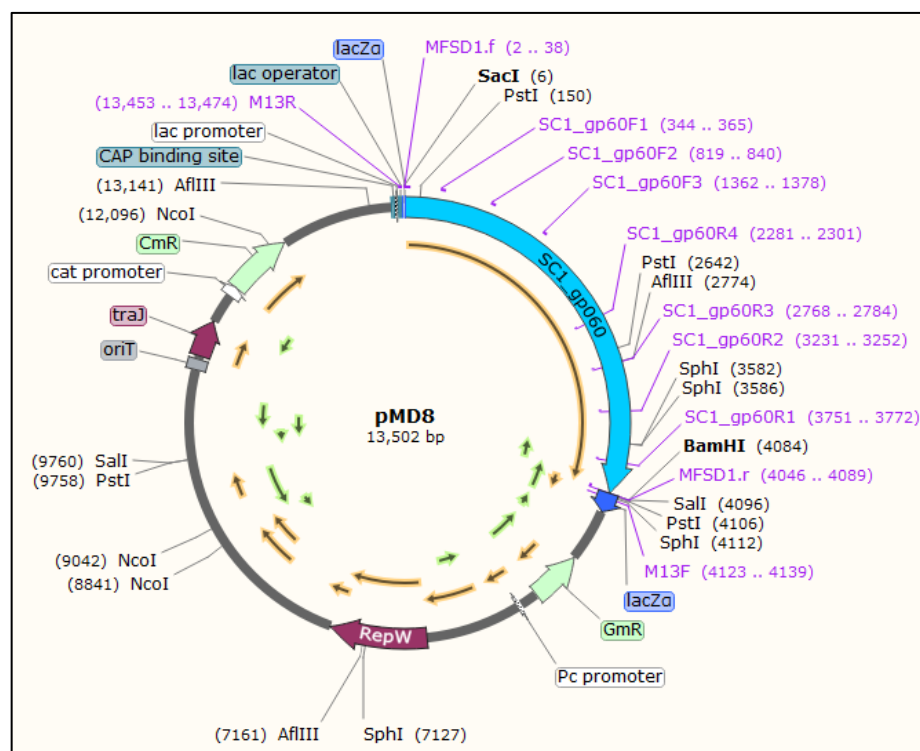


APÊNDICE C – Construções em pUFR071

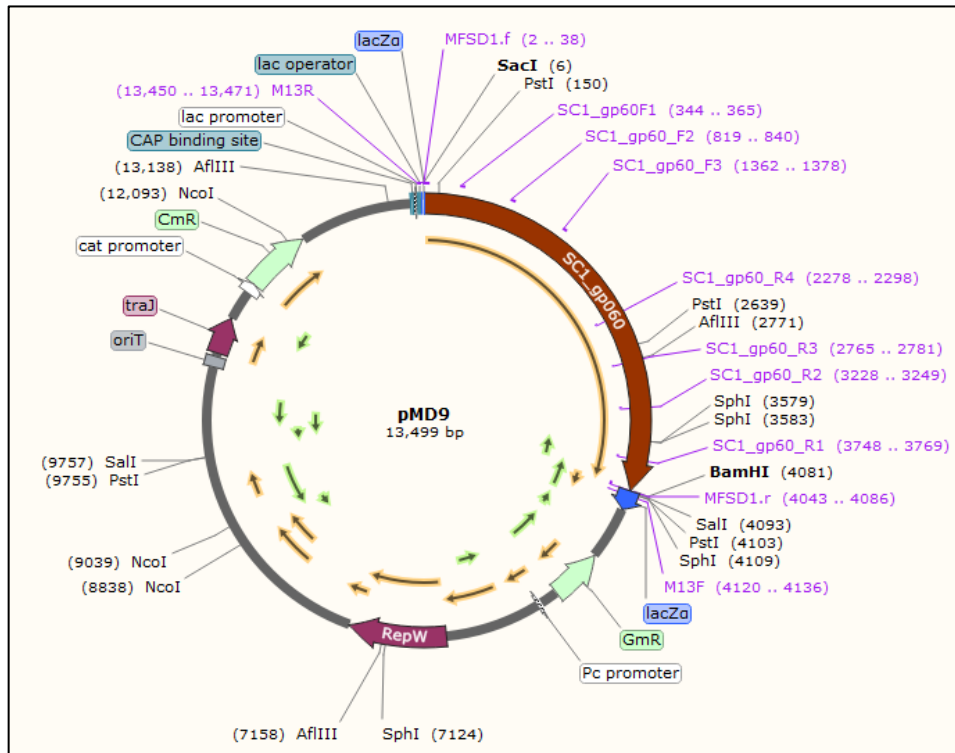
i) pMD7 (lam_678 isolado Lam São Paulo + pUFR071)



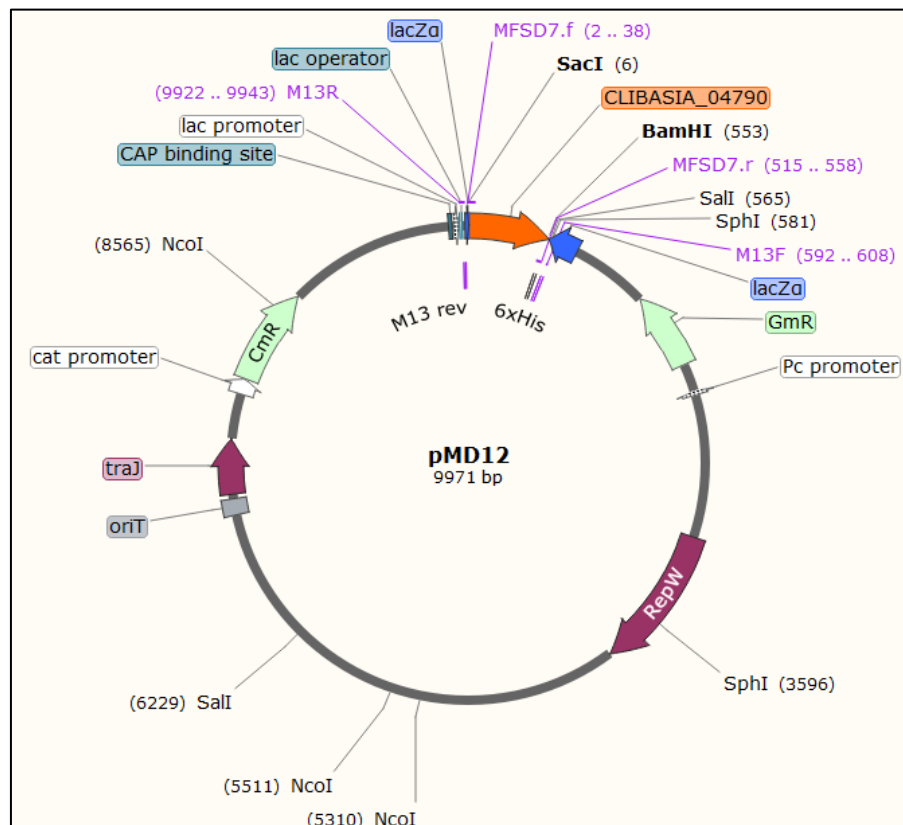
ii) pMD8 (SC1_gp060 isolado Las Poona + pUFR071)



iii) pMD9 (SC1_gp060 isolado Las 2PA + pUFR071)

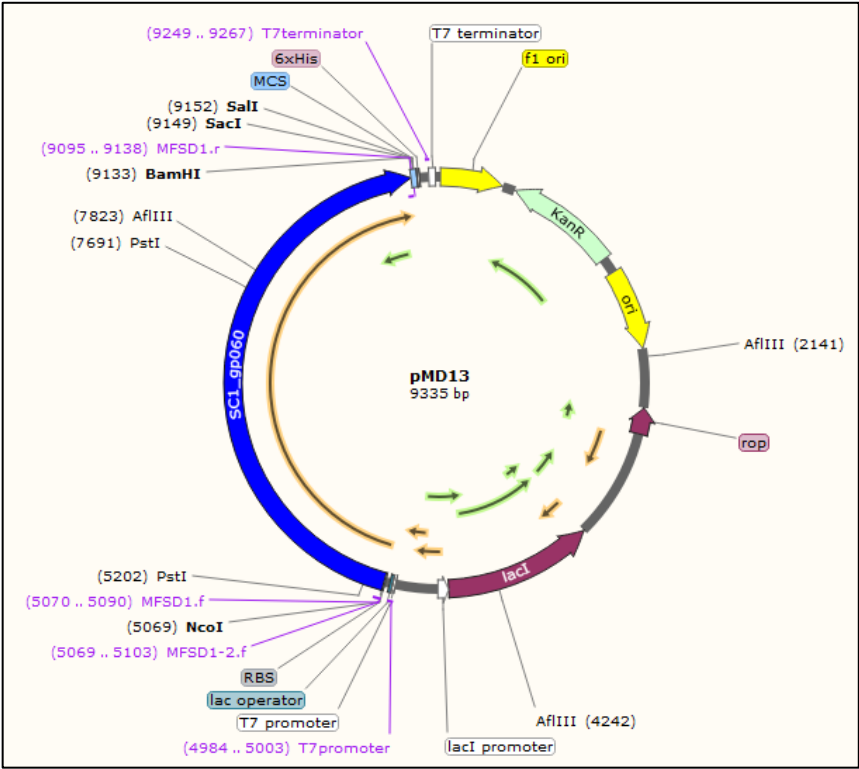


iv) pMD12 (CLIBASIA_04790 isolado Las 4PA + pUFR071)

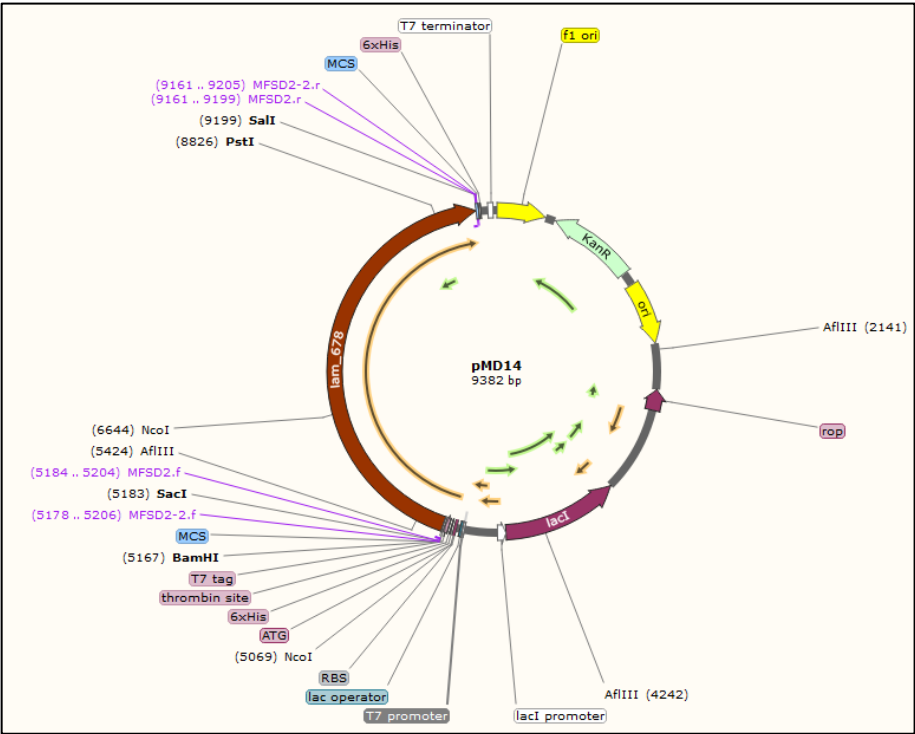


APÊNDICE D – Construções em pET28a

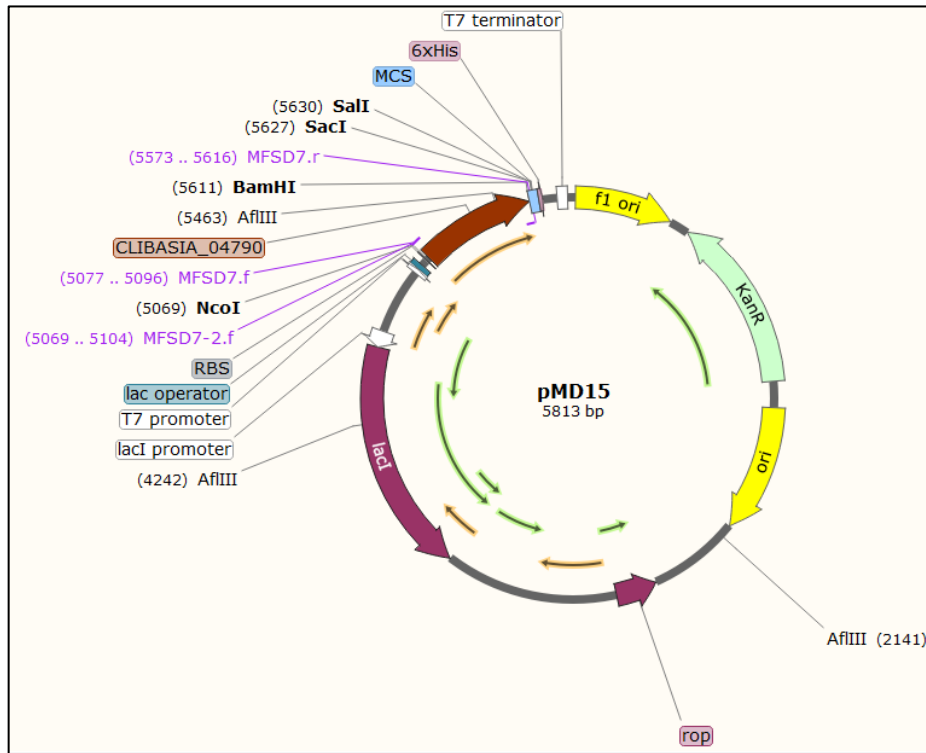
i) pMD13 (SC1_gp060 isolado Las 2PA + pET28a)



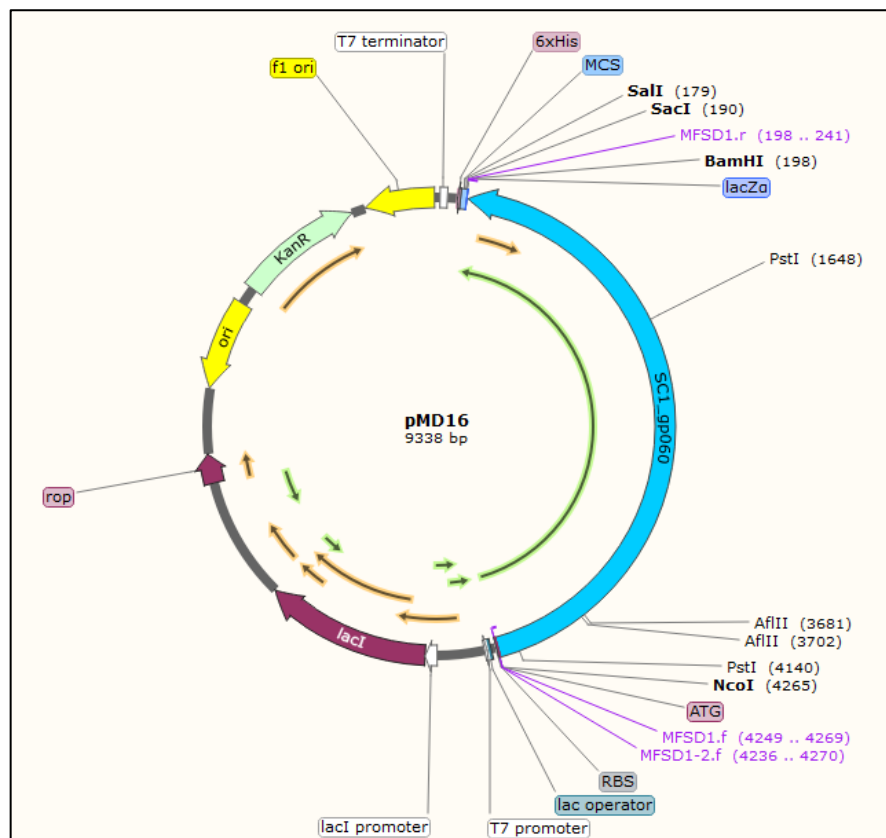
ii) pMD14 (lam_678 isolado Lam São Paulo + pET28a)



iii) pMD15 (CLIBASIA_04790 isolado Las 4PA + pET28a)



iv) pMD16 (SC1_gp060 isolado Las Poona + pET28a)



v) pMD17 (ED07_RS0204515 aislado Las 3PA + pET28a)

