

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE FUNCIONAL DAS ORFs XAC2361 E XAC3898 DE
Xanthomonas citri subsp. *citri* AGENTE CAUSAL DO
CANCRO CÍTRICO**

Tamiris Kempner
Engenheira Agrônoma

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**ANÁLISE FUNCIONAL DAS ORFs XAC2361 E XAC3898 DE
Xanthomonas citri subsp. *citri* AGENTE CAUSAL DO
CANCRO CÍTRICO**

Tamiris Kempner

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

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

K32a Kempner, Tamiris
Análise funcional das ORFs XAC2361 E XAC3898 de
Xanthomonas citri subsp. *citri* agente causal do cancro cítrico / Tamiris
Kempner. -- Jaboticabal, 2018
xi, 70 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018

Orientador: Jesus Aparecido Ferro

Banca examinadora: Henrique Ferreira, Rafael Marini Ferreira,
Fabricio José Jaciani, Helen Alves Penha

Bibliografia

1. Microscopia. 2. Mutagênese sítio-dirigida. 3. Patogenicidade. 4.
Peptidase-M23. 5. Virulência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.23

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE FUNCIONAL DAS ORFs XAC2361 E XAC3898 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO

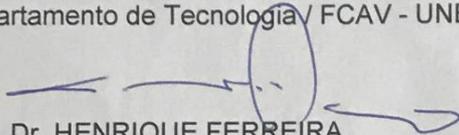
AUTORA: TAMIRIS KEMPNER

ORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

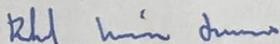
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



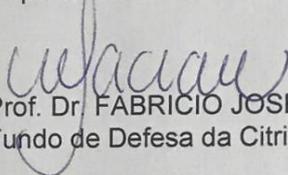
Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal



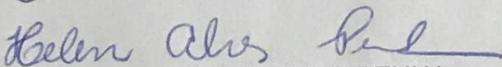
Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências / UNESP / Rio Claro



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



Prof. Dr. FABRÍCIO JOSÉ JACIANI
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDECITRUS - Araraquara/SP



Pós-doutoranda HELEN ALVES PENHA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de março de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Tamiris Kempner, nascida no dia 04 de outubro de 1987, no município de Abaetetuba, Pará. Concluiu o ensino médio em 2005 e em 2007 iniciou o curso de Agronomia na UFRA (Universidade Federal Rural da Amazônia) o qual foi concluído no ano de 2011. Em 2012 iniciou o mestrado em Agronomia (Melhoramento Genético de Plantas), na UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco), defendeu a dissertação em 2014, e no mesmo ano iniciou o doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na UNESP/FCAV.

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus que me permitiu concluir mais essa jornada, que não foi fácil, mas muito gratificante. Agradeço imensamente à minha família, principalmente à minha mãe Teresinha Kempner e meu pai Elias Kempner e também aos meus irmãos, sobrinhos e sobrinhas, tios e tias, à minha avó Maria e todos os familiares que mesmo de longe torceram e me ajudaram de alguma forma. Por sempre me apoiarem e me incentivarem nos momentos de dificuldade, fraqueza e falta de motivação, e que nos momentos bons celebraram as pequenas conquistas que fui obtendo durante esta jornada, que resultaram numa conquista maior.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela orientação, apoio e por todo conhecimento transmitido, e também à Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro pelo suporte junto as atividades e execuções dos experimentos.

Agradeço também, a todos os amigos e colegas de laboratório, pela amizade, companheirismo e ensinamentos. Agradeço à todas as godinhas, especialmente à Julie Anne, Ana Carolina, Helen e Claudênia que sempre demonstraram um carinho imenso por mim, cuidando, me incentivando e comemorando as vitórias e sendo um ombro amigo nas dificuldades do dia-a-dia. Agradeço muito à Flávia Carvalho, nossa Flávia-mãe, que realmente é uma mãezona, pela paciência, pelo que me ensinou durante o doutorado e pelas contribuições na minha tese.

Agradeço às meninas que trabalham no CREBIO, Agda, Mariza e Renata, pelos serviços prestados, apoio e amizade.

Agradeço às minhas queridas amigas desde a graduação Rafaelle e Josiane que me acolheram quando cheguei em Jaboticabal. À todos os amigos que torceram e me apoiaram mesmo estando longe. Aos amigos que fiz aqui e que levarei para sempre no coração.

Agradeço ao Prof. Dr. Henrique Ferreira e aos seus orientados Lúcia e Kenny do Laboratório de Genética de Bactérias da Unesp - Câmpus de Rio Claro, que me auxiliaram nos experimentos de curva *in vitro*, microscopia e Western blot. Pela disponibilidade, paciência e todo o conhecimento repassado.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas, e à todos os professores que tive ao longo da vida, os quais foram fundamentais para que eu completasse mais esta etapa. Aos

coordenadores do programa durante o período do doutorado, Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério e Prof. Dr. Gustavo Vitti Moro pelo apoio, disponibilidade, compreensão e atenção dispensada.

Agradeço à Seção Técnica de Pós-Graduação e seus funcionários, pela disponibilidade e atenção.

Agradeço aos membros da banca pelas correções e contribuições para melhorar a minha tese.

Enfim, agradeço à todos que de uma forma ou de outra fizeram parte dessa caminhada e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

SUMÁRIO

Página

SUMÁRIO.....	i
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Importância da citricultura no Brasil	4
2.2 Cancro cítrico: agente etiológico, sintomatologia, disseminação e controle	5
2.3 Caracterização das ORFs XAC2361 e XAC3898	8
2.4 Mutação sítio-dirigida como ferramenta no nocaute gênico	12
2.5 Microscopia de fluorescência na localização de proteínas	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Obtenção dos DNAs das ORFs XAC2361 e XAC3898.....	18
4.2 Mutação sítio-dirigida das ORFs XAC2361e XAC3898	18
4.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos.....	18
4.2.2 Obtenção e purificação dos fragmentos A-B, C-D e A-D das ORFs XAC2361 e XAC3898	20
4.2.3 Preparo de células de <i>E. coli</i> DH10B quimicamente competentes	23
4.2.4 Clonagem do fragmento A-D da ORF XAC3898 em vetor pGEM®-T Easy e transformação em <i>E. coli</i> DH10B quimicamente competente.....	24
4.2.5 Digestão da construção pGEM®-T Easy contendo o fragmento A-D da ORF XAC3898 e do vetor suicida pNPTS138 com enzimas de restrição	25
4.2.6 Digestão do fragmento A-D da ORF XAC2361 e do vetor suicida pNPTS138 com enzimas de restrição	25
4.2.7 Clonagem em vetor suicida pNPTS138 e transformação em <i>E. coli</i> DH10B quimicamente competente.....	26

4.2.8	Preparo de células eletrocompetentes de <i>Xac306</i>	26
4.2.9	Transformação em células eletrocompetentes de <i>Xac306</i>	27
4.2.10	Seleção e confirmação dos mutantes	27
4.2.11	Confirmação da identidade da <i>Xac306</i> mutada	28
4.3	Teste de patogenicidade em limão cravo (<i>Citrus limonia</i> Osbeck).....	29
4.4	Curva de crescimento <i>in vitro</i>	30
4.5	Curva de crescimento <i>in planta</i>	30
4.6	Ensaio de autoagregação	31
4.7	Ensaio de formação de biofilme	31
4.8	Extração e quantificação de goma xanthana	32
4.9	Avaliação da motilidade	32
4.10	Sobrevivência em SDS	33
4.11	Análise da ORF XAC2361 por microscopia de fluorescência	33
4.11.1	Obtenção da ORF XAC2361 com o peptídeo sinal.....	33
4.11.2	Digestão da ORF2361 e do vetor pMAJ1	34
4.11.3	Clonagem no vetor pMAJ1 e transformação em <i>E. coli</i> DH10B quimicamente competentes	34
4.11.4	Transformação em células eletrocompetentes de <i>Xac306</i>	34
4.11.5	Seleção dos transformantes	34
4.11.6	Microscopia de fluorescência.....	35
4.12	Detecção da proteína de fusão XAC2361-mCherry por Western blot.....	35
4.13	Microscopia eletrônica de varredura	36
4.14	Análise estatística	37
5	RESULTADOS	38
5.1	Teste de patogenicidade em limão cravo (<i>Citrus limonia</i> Osbeck).....	38
5.2	Curva <i>in vitro</i>	39
5.3	Curva de crescimento <i>in planta</i>	40
5.4	Ensaio de autoagregação	41
5.5	Ensaio de formação de biofilme	43
5.6	Extração e quantificação de goma xanthana	44
5.7	Avaliação da motilidade	45
5.8	Sobrevivência em SDS	46
5.9	Análise da proteína de fusão XAC2361-mCherry por microscopia de fluorescência.....	47

5.10 Detecção da proteína de fusão XAC2361-mCherry por Western blot.....	50
5.11 Microscopia eletrônica de varredura	50
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO.....	59
8 REFERÊNCIAS.....	60

ANÁLISE FUNCIONAL DAS ORFs XAC2361 E XAC3898 DE *Xanthomonas citri* subsp. *citri* AGENTE CAUSAL DO CANCRO CÍTRICO

RESUMO - Diante da importância do cancro cítrico para a citricultura mundial, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, o agente causal da doença, tem sido amplamente estudada. Pesquisadores brasileiros realizaram o sequenciamento completo do genoma da *X. citri* subsp. *citri* isolado 306 (*Xac306*), com o intuito de elucidar os genes e mecanismos envolvidos na patogenicidade e/ou virulência da bactéria. As ORFs XAC2361 e XAC3898 possuem tamanhos e locais diferentes no genoma da *Xac306*, mas têm em comum o domínio Peptidase_M23, cujo processo biológico predito é de hidrolase de parede celular, mas a real função destas proteínas em *Xac* ainda é desconhecida. Este trabalho teve como objetivo avaliar, por meio da mutação sítio-dirigida, se as ORFs XAC2361 e XAC3898 estão relacionadas com a virulência e/ou patogenicidade de *X. citri* subsp. *citri* 306 e com o desenvolvimento do cancro cítrico. Para isso, foram realizados testes *in vitro* e *in planta* dos mutantes obtidos, visando observar alterações fenotípicas. Devido a presença de peptídeo sinal, a ORF XAC2361 foi fundida à proteína fluorescente mCherry (XAC2361-mCherry) para expressão *in vivo* e avaliação por microscopia de fluorescência. As análises fenotípicas demonstraram que o mutante Δ XAC2361 não apresentou alterações nos sintomas quando avaliado em limoeiro cravo (*Citrus limonia* Osbeck), porém apresentou menor capacidade de crescimento *in vitro*, menor motilidade *swimming* e *swarming* e menor capacidade de sobrevivência em SDS. Por outro lado, o mutante Δ XAC3898 apresentou uma significativa redução na virulência, menor capacidade de crescimento *in planta*, maior capacidade de crescimento *in vitro*, menor capacidade de agregação, maior produção de goma e biofilme e a avaliação por microscopia eletrônica de varredura mostrou que houve uma redução no comprimento das células da bactéria. A análise por microscopia de fluorescência da proteína de fusão XAC2361-mCherry mostrou, predominantemente, uma fluorescência dispersa, o que é um indício de que a mesma pode estar sendo direcionada para o citoplasma. Apesar disso, não foi possível confirmar a expressão da proteína de fusão XAC2361-mCherry por meio de Western-blot. Diante dos resultados obtidos, sugere-se que o domínio Peptidase_M23 está de alguma forma envolvido com a virulência e/ou patogenicidade de *Xac*, atuando na formação da parede celular.

Palavras-chave: Microscopia, Mutagênese sítio-dirigida, Patogenicidade, Peptidase-M23, Virulência

FUNCTIONAL ANALYSIS OF ORFs XAC2361 AND XAC3898 OF *Xanthomonas citri* subsp. *citri* CAUSAL AGENT OF CITRUS CANCER

ABSTRACT - In view of the importance of citrus canker in citrus culture worldwide, the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, the causal agent of this disease, has been extensively studied. Brazilian researchers performed the complete sequencing of the genome of *X. citri* subsp. *citri* isolate 306 (*Xac306*), in order to elucidate the genes and mechanisms involved in the pathogenicity and/or virulence of *Xac*. The ORFs XAC2361 and XAC3898 have different sizes and location in the genome, but have in common the M23 Peptidase domain, whose biological process is predicted to act as cell wall hydrolase, but the actual function of these proteins in *Xac* is still unknown. This work aimed to evaluate, through site-directed mutagenesis, whether XAC2361 and XAC3898 ORFs are related to the virulence and / or pathogenicity of *Xac306* and the development of citrus canker. In order to observe phenotypic changes, *in vitro* and *in planta* tests of the mutants were carried out. Due to the presence of signal peptide, the ORF XAC2361 was fused to the mCherry fluorescent protein (XAC2361-mCherry) for *in vivo* expression and fluorescence microscopy evaluation. Phenotypic analyzes demonstrated that the Δ XAC2361 mutant showed no change in symptoms when evaluated in Mexican lime (*Citrus limonia* Osbeck), but presented lower *in vitro* growth capacity, lower swimming and swarming motility, and lower survival capacity in SDS. On the other hand, the Δ XAC3898 mutant showed a significant reduction in virulence, lower *in plant* growth capacity, higher *in vitro* growth capacity, lower aggregation capacity, higher gum production and biofilm, and scanning electron microscopy evaluation showed that there was a reduction in cell length. Microscopy analysis of the XAC2361-mCherry fusion protein showed predominantly dispersed fluorescence, which is an indication that it may be being directed to the cytoplasm. Despite this, the expression of XAC2361-mCherry fusion protein could not be confirmed by Western blotting. In view of the obtained results, it is suggested that the Peptidase_M23 domain is in some way involved with the virulence and/or pathogenicity of *Xac*, acting in the formation of the cellular wall.

Keywords: Microscopy, Site-directed mutagenesis, Pathogenicity, Peptidase_M23, Virulência

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos para obtenção do mutante da ORF XAC2361 (os oligonucleotídeos A e D foram desenhados com os sítios das enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI, respectivamente.....	19
Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante da ORF XAC3898.....	19
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos fragmentos A-D clonados nos vetores pGEM-T Easy e pNPTS138.....	25
Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos para obtenção da ORF XAC2361, ambos possuem o sítio da enzima de restrição <i>Xho</i> I.....	33

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Escala de tolerância e suscetibilidade das espécies e variedades comerciais de citros que podem ser afetadas pelo cancro cítrico (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017).....**8**
- Figura 2.** Domínios apresentados pelas proteínas codificadas pelas ORFs XAC2361 e XAC3898 quando analisadas *in silico* (Blastp do NCBI). A) XAC2361, com 280 aminoácidos B) XAC3898, com 472 aminoácidos. O Domínio Peptidase_M23 de cada uma delas é mostrado (NCBI, 2017).....**10**
- Figura 3.** Resultado da busca de presença dos peptídeos sinais Sec e Tat na ORF XAC2361 no programa PRED-TAT (BAGOS et al., 2010). O programa prediz um peptídeo sinal Sec formado pelos primeiros 24 aminoácidos, com sítio de clivagem entre os aminoácidos 24 e 25 (...ADA ↓ QS.....)**11**
- Figura 4.** Resultado da busca de presença dos peptídeos sinais Sec e Tat na ORF XAC3898 no programa PRED-TAT (BAGOS et al., 2010). O programa prediz um peptídeo sinal Tat formado pelos primeiros 70 aminoácidos, com sítio de clivagem entre os aminoácidos 70 e 71 (...SNA ↓ ID.....)**12**
- Figura 5.** Mutação sítio dirigida por deleção. Adaptado de LEE et al. (2004) por Martins (2016). A região azul corresponde ao gene a ser deletado total ou parcialmente.....**13**
- Figura 6.** Mapa do vetor suicida pNPTS138 (Dickon Alley M.R.K., dados não publicados), adaptado de (CAPPELLETTI, 2010).....**14**
- Figura 7.** Mapa do vetor pMAJ1 construído por (PENA, M. M., não publicado).....**16**
- Figura 8.** Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC2361 obtida através *Genbank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As letras vermelhas indicam a região intergênica. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas e indicadas pelas cores amarelo, vermelho, azul e lilás, respectivamente.....**20**

Figura 9. Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC3898 obtida através *Genbank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas e indicadas pelas cores vermelho, amarelo, verde e azul, respectivamente.....**20**

Figura 10. Diagrama esquemático da deleção parcial da ORF XAC2361, demonstrando a posição dos primers A, B, C e D, além do peptídeo sinal e de parte da região intergênica em azul claro, a região em vermelho foi deletada.....**22**

Figura 11. Diagrama esquemático da deleção parcial da ORF XAC3898, demonstrando a posição dos primers A, B, C e D, a região em vermelho foi deletada.....**22**

Figura 12. Gel de agarose demonstrando os fragmentos A-B, C-D e A-D das ORFs XAC2361 e XAC3898 obtidos por meio de PCR e purificados. 1 a 3: ORF XAC2361. 1) A-B (359 pb), 2) C-D (298 pb), 3) A-D (657 pb). 4 a 6: ORF XAC3898. 4) A-B (490 pb), 5) C-D (285 pb), 6) A-D (775 pb), M: marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 µg/mL).....**23**

Figura 13. Gel de agarose com os produtos das PCRs dos DNAs genômicos das colônias de *Xac306* mutadas utilizando os respectivos oligonucleotídeos A e D de cada ORF. 1 a 3: colônias da ORF XAC3898 mutada (Δ XAC3898); 4 a 7: colônias da ORF XAC2361 mutada (Δ XAC2361). M: Marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas) Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 µg/mL).....**28**

Figura 14. Gel de agarose com os produtos das PCRs dos DNAs genômicos utilizando os oligonucleotídeos específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac 01 e Xac 02). 1) água ultrapura estéril, 2) DNA de *Xac306*, 3) DNA de XauB, 4) DNA de XauC, 5 a 7) DNA de três colônias de Δ XAC3898, 8 a 11) DNA de quatro colônias de Δ XAC2361. M: Marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 µg/mL).....**29**

Figura 15. Foto do teste de patogenicidade em limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). Suspensões bacterianas contendo 10^6 UFC/mL inoculadas na face abaxial das folhas. À direita da nervura principal, o mutante Δ XAC2361, e à esquerda a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (3, 10, 18, 25 e 30 dias após a inoculação). A: Superfície adaxial da folha. B: Superfície abaxial da folha.....**38**

Figura 16. Foto do teste de patogenicidade em limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). Suspensões bacterianas contendo 10^6 UFC/mL inoculadas na face abaxial das folhas. À direita da nervura principal, o mutante Δ XAC3898, e à esquerda a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (3, 10, 18, 25 e 30 dias após a inoculação). A: Superfície adaxial da folha. B: Superfície abaxial da folha.....**39**

Figura 17. Curva *in vitro* comparando o crescimento em meio de cultura NB dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em relação a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, no período de 24 h. Leituras da DO_{600nm} a cada hora, com os respectivos desvios padrões. A curva foi construída com o programa Prisma versão 6.0.....**40**

Figura 18. Curva de crescimento *in planta* dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em relação a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, entre os dias 0 e 20 após a inoculação. O inóculo inicial continha 10^6 UFC/mL.....**41**

Figura 19. Autoagregação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898, durante o período de 24 h (leituras a cada hora durante 12 h e leitura final após 24 h, sem agitação).....**42**

Figura 20. Fotografia ilustrando o ensaio de autoagregação dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em comparação com a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 após 12 horas sem agitação.....**42**

Figura 21. Formação de biofilme pela estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e pelos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....**43**

Figura 22. Fotografia ilustrando a formação de biofilme pela estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e pelos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em tubos de ensaio tipo borossilicato.....**43**

Figura 23. A) Quantidade de biomassa e goma xantana produzida por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e pelos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898. B) Relação de goma/biomassa em cada linhagem bacteriana. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....**44**

Figura 24. A) Motilidade *swimming*; B) Motilidade *swarming* da estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.....**45**

Figura 25. A) Fotografia ilustrando a motilidade tipo *swimming* da estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898, da esquerda para a direita. B) Fotografia ilustrando a motilidade tipo *swarming* da estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898, da esquerda para a direita.....**46**

Figura 26. Sobrevivência dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em comparação a estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, após serem submetidos a SDS (Dodecil sulfato de sódio) na concentração final de 0,003%.....**47**

Figura 27. Fotografia ilustrando o teste de degradação do amido em meio NA contendo 0,2% de amido e corado com iodo metálico, onde observa-se a formação de halo ao redor da colônia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem (ao centro) e também das colônias onde o plasmídeo se integrou na região da ORF. Nas colônias onde não há a formação de halo, a integração do plasmídeo ocorreu no sítio *Amy*.....**48**

Figura 28. Fotografia ilustrando a microscopia de fluorescência da proteína de fusão XAC2361-mCherry, em células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, utilizando microscópio de fluorescência Olympus BX61, fonte de luz a lâmpada de fluorescência X-Cite® SERIES 120 Q e as imagens registradas pela câmera de microscópio Orca Flash 2.8 (Hamamatsu). A) Proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada em *Amy* após 2h de indução com 0,05% de arabinose. B) Proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada em *Amy* não induzida. C) Proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada na região da ORF XAC2361 após 4h de indução com 0,05% de arabinose.....**49**

Figura 29. A) Gel SDS-PAGE demonstrando as proteínas totais extraídas das amostras coletadas após 2 e 4 s de crescimento partindo da $DO_{600nm} = 0,1$. M) True Color High Range Protein Marker (Sinapse ino). 1) Controle positivo (pMAJ1 em *E. coli* após 1 h de indução com 0,05% de arabinose). 2 e 3) Controle positivo (pMAJ1 em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 após 2 e 4 h de indução com 0,05% de arabinose). 4 e 5) *X. citri* subsp. *citri* 306 após 2 e 4 h de crescimento. 6 e 7) *X. citri* subsp. *citri* 306 contendo a proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada na região da ORF XAC2361 após 2 e 4 h de crescimento. 8 e 9) *X. citri* subsp. *citri* 306 contendo a proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada no sítio *Amy* após 2 e 4 h de crescimento. 10 e 11) *X. citri* subsp. *citri* 306 contendo a proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada no sítio *Amy* após 2 e 4 h de crescimento com indução a 0,05% de arabinose. B) Filme de raio-x mostrando detecção da proteína mCherry, por meio de western blot, utilizando anticorpo primário mCherry Polyclonal Antibody (Invitrogen) e o anticorpo secundário Anti Rabbit – Gt x Rb 1gG (H+L) HRP Ap 307p (Millipore), seguindo a ordem das amostras descritas no item A.....**50**

Figura 30. Fotografia ilustrando a microscopia eletrônica de varredura de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem (A), do mutante Δ XAC2361 (B) e do mutante Δ XAC3898 (C), utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss Evo MA10, operando em 15 kV.....**51**

Figura 31. Relação entre a largura e comprimento das células *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem e dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898, por análise das imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura. O asterisco representa uma significância estatística de $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.....**52**

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de citros do mundo, com uma produção de aproximadamente 15,7 milhões de toneladas de frutos de laranja, além de ser o maior exportador de suco de laranja concentrado, respondendo por cerca de 73% do comércio mundial. O estado de São Paulo é o maior produtor de citros do país, com uma produção de quase 12,5 milhões de toneladas de frutos de laranja, o que corresponde a aproximadamente 79% da produção nacional (AGRIANUAL, 2017).

Entre os diversos problemas fitossanitários que têm acometido a citricultura brasileira e afetado a produção, o cancro cítrico destaca-se como um dos mais graves problemas das culturas cítricas (OLIVEIRA et al., 2008; BELASQUE JÚNIOR et al., 2005). O cancro cítrico asiático, causado pela estirpe A da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, (*Xac*) é o tipo de maior importância econômica. Esta doença é observada em muitas regiões da Ásia e Américas, afetando um grande número de espécies, híbridos e variedades de *Citrus* e gêneros afins (ROSA, 2010). A *Xac* faz parte da família Xanthomonadaceae, que destaca-se como um dos maiores e mais importantes grupos de bactérias fitopatogênicas, além disso, tem sido utilizada como modelo para estudos de patogênese e filogenia (FERENCE et al., 2017).

A partir da disponibilização do genoma completo do isolado 306 da *X. citri* subsp. *citri* (*Xac306*) por um grupo de pesquisadores brasileiros (DA SILVA et al., 2002), muitos estudos têm sido realizados visando a compreensão a nível molecular do patossistema *Xac*-Citros, através da identificação de genes envolvidos na patogenicidade e virulência da bactéria, como o trabalho realizado por Laia et al. (2009) que produziu uma biblioteca com 10.000 mutantes, obtidos por meio da inserção aleatória do transposon EZ-Tn5, a partir da linhagem selvagem de *Xac306*. Dentre os mutantes obtidos, muitos apresentaram alteração no padrão de virulência e/ou patogenicidade, que variaram desde a diminuição dos sintomas até a ausência completa dos mesmos.

O sequenciamento do genoma da *Xac306* revelou a presença de nove ORFs (Open Read Frames) que possuem domínio Peptidase_M23, sendo elas: XAC0024, XAC0466, XAC0787, XAC1728, XAC2361, XAC2928, XAC3041, XAC3368 e XAC3898. As ORFs XAC2361 e XAC3898 foram eleitas para estudos mais

aprofundados na tentativa de melhor compreender suas funções e seus possíveis papéis nas interações da bactéria com o hospedeiro.

O domínio Peptidase_M23 é amplamente encontrado em bactérias. Muitas proteínas dessa família possuem um íon de zinco no seu domínio catalítico, o que contribui para a sua atividade de protease (OKUMURA et al., 2013). O domínio Peptidase_M23 é predito como sendo um domínio de hidrolase da parede celular, no entanto sua função ainda não é totalmente esclarecida. Sabe-se que esse domínio possui atividade hidrolítica, o que lhe permite realizar a digestão da ligação Gly-Gly, atuando sobre o peptidoglicano (PG) (SUDIARTA; FUKUSHIMA; SEKIGUCHI, 2010). O PG é um heteropolímero composto de cadeias de glicanos ligadas por uma única curta e flexível ligação peptídica, sendo o principal componente da parede celular de procariotos, que por sua vez é responsável pelos diversos formatos das células bacterianas (BONIS et al., 2010). Além disso, o PG é responsável por evitar a lise das células, devido a pressão de turgor (SYCURO et al., 2010).

A mutação sítio-dirigida é uma importante ferramenta empregada com o intuito de esclarecer a função de genes. A técnica de mutagênese sítio-dirigida pode suprimir genes de interesse utilizando a estratégia de recombinação homóloga através de um plasmídeo suicida (KANIGA; DELOR; CORNELIS, 1991). Bonis et al. (2010) realizaram a mutação de um gene de *Helicobacter pylori*, pertencente à família das metalopeptidases M23B, o que ocasionou alterações no fenótipo, tais como redução do crescimento, baixa adesão as células alvo e motilidade em ambiente viscoso e alteração no formato das células. Isso reforça os indícios de que o domínio Peptidase_M23 em bactérias pode estar relacionado à patogenicidade e ou virulência, e também na formação do PG.

As proteínas fluorescentes são ferramentas muito importantes nos estudos de expressão gênica e na localização de proteínas em uma ampla gama de organismos. A presença do peptídeo sinal na ORF XAC2361 indica que ela é endereçada para algum local, provavelmente para o periplasma. Desse modo, a fusão desta com a proteína fluorescente mCherry e sua expressão *in vivo* permite observar, por microscopia de fluorescência, para que lugar da célula a proteína é direcionada.

O conhecimento sobre a função das proteínas é fundamental para o entendimento dos processos metabólicos dos organismos, além de esclarecer, quando se trata de microorganismos patogênicos, sobre os processos de infecção, patogenicidade e virulência. No caso do cancro cítrico, o entendimento da ação das

proteínas relacionadas aos processos patogênicos pode auxiliar no desenvolvimento de novas formas de controle da doença, sendo um grande benefício para a citricultura mundial.

Assim, por meio da mutação sítio-dirigida por deleção, foi realizada a avaliação funcional das ORFs XAC2361 e XAC3898, visando determinar se as mesmas estão relacionadas com a virulência e patogenicidade de *Xac306* e com o desenvolvimento do cancro cítrico. Também foi realizada a análise por microscopia de fluorescência, visando a identificação da localização da proteína de fusão XAC2361-mCherry. Além disso, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de observar possíveis mudanças na estrutura e formato das células.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da citricultura no Brasil

Os citros compreendem um grande grupo de plantas da família Rutaceae, englobando espécies do gênero *Citrus*, assim como dos gêneros filogeneticamente relacionados, *Poncirus* e *Fortunella*, e têm seu centro de origem na Ásia (OLIVEIRA, 2006; LOPES et al., 2011). As culturas cítricas foram introduzidas no Brasil através das primeiras expedições colonizadoras, entre 1530 e 1540, quando as primeiras sementes de laranja doce foram plantadas nos estados da Bahia e São Paulo, encontrando no país condições mais apropriadas para vegetar e produzir do que na sua própria região de origem, expandindo-se por todo o território nacional (AZEVEDO, 2003; NEVES et al., 2010; ZILLI; GARCIA, 2010).

Desde que começaram as primeiras exportações, em 1962, a citricultura tem contribuído grandemente para a economia e desenvolvimento do país, devido seu grande valor de exportação, além da sua importância social, atuando na geração de empregos, com cerca de 230 mil empregos diretos e indiretos, e também permite que pequenos proprietários permaneçam com suas famílias sobrevivendo no campo. (NEVES et al., 2010; ROSSETO et al., 2011).

O Brasil destaca-se como o maior produtor de citros do mundo, com uma produção de aproximadamente 15,7 milhões de toneladas de frutos de laranja, além de ser o maior exportador de suco de laranja concentrado, respondendo por cerca de 73% do comércio mundial (AGRIANUAL, 2017). O estado de São Paulo é o maior produtor de citros do país, com uma produção de quase 12,5 milhões de toneladas de frutos de laranja, o que corresponde a aproximadamente 79% da produção nacional (AGRIANUAL, 2017). Estima-se que, a cada cinco copos de laranja consumidos no mundo, três são produzidos no Brasil (NEVES et al., 2010)

No entanto, o setor citrícola nacional têm enfrentado grandes dificuldades, quando em 2012 houve diminuição do consumo de suco no mercado externo e, conseqüentemente a elevação dos estoques, além do aumento de custo de produção devido aos problemas fitossanitários e climáticos. Devido à falta de mercado para escoar a produção, muitos produtores abandonaram as frutas nos pomares, o que intensificou os problemas fitossanitários, com danos muitas vezes irreversíveis nas

plantas e até erradicação completa de pomares, o que acabou comprometendo a safra 2013/14 (CONAB, 2013). E conseqüentemente acabou afetando as safras seguintes.

Entre os problemas fitossanitários que acometem a citricultura, as doenças têm exercido um papel de destaque como as principais responsáveis pelas perdas e diminuição da produção e dos pomares ao longo dos últimos anos, sendo as quatro principais: o cancro cítrico, a CVC (clorose variegada dos citros), a morte súbita e o *greening* (NEVES et al., 2010). O cancro cítrico tem causado grandes prejuízos para a citricultura por ocorrer em todas as variedades de citros de importância comercial, causando a desfolha das plantas e, conseqüentemente, prejuízos à produção. As lesões de cancro cítrico depreciam a qualidade dos frutos para o mercado *in natura* e restringem a comercialização da produção. Além disso, os frutos afetados caem prematuramente e levam à redução da produtividade (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017).

2.2 Cancro cítrico: agente etiológico, sintomatologia, disseminação e controle

O cancro cítrico é uma das doenças mais antigas e estudadas da citricultura mundial, sendo endêmica em muitos países, como Estados Unidos, China, Japão, Índia, Argentina, Uruguai e Paraguai. No Brasil, a doença foi constatada pela primeira vez em 1957, sendo considerada como praga quarentenária A2, ou seja, a praga está presente no país ou região, porém está limitada a uma determinada área oficialmente controlada (OLIVEIRA et al., 2008).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xac*) é a causadora do cancro cítrico asiático, sendo divididas em três estirpes, sendo as do tipo A as mais agressivas e difundidas nos pomares de todo o mundo, as estirpes A* e A^w estão restritas à Ásia e à Flórida, respectivamente, infectando lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia*). Enquanto que, a espécie *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* é causadora da cancrose, sendo dividida em duas estirpes (*XauB* e *XauC*) que apresentam distribuição geográfica e gama de hospedeiros limitadas. A estirpe B é restrita à América do Sul (Argentina, Uruguai e Paraguai), causando cancro no limão (*Citrus limon*), lima ácida 'Galego', laranja-doce (*C. sinensis*) e toranja (*Citrus x paradisi*), enquanto a estirpe C é restrita ao Brasil, especificamente ao estado de São Paulo, infectando apenas a lima ácida 'Galego' e citrumelo 'Swingle' (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*). Há ainda a espécie *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* que causa a mancha bacteriana dos citros, e que foi relatada

apenas na Flórida infectando citrumelo 'Swingle' (JACIANI et al., 2012; JALAN et al., 2013).

A *Xac* é uma bactéria Gram-negativa, membro das proteobactérias (classe Gammaproteobacteria), aeróbia, baciliforme, com um flagelo polar, facilmente isolada e cultivada em meio de cultura em laboratório. As colônias resultantes do crescimento bacteriano em meio de cultura sólido apresentam coloração amarela, bordas lisas e aspecto viscoso (BEHLAU; BELASQUE JR, 2014).

Os sintomas da doença podem aparecer nas folhas, frutos e ramos e se apresentam, inicialmente, como pequenas manchas amarelas que depois se desenvolvem, tornando-se maiores e de coloração marrom, geralmente, podem surgir lesões salientes, sendo comum o aparecimento de um anel amarelo ao redor das lesões de cor marrom. Nos frutos, o progresso das lesões facilita a ocorrência de rachaduras, acelerando o processo de apodrecimento e queda (FUNDECITRUS, 2008). Além disso, o cancro cítrico, quando bem estabelecido na planta, pode causar a destruição da área foliar, reduzindo a capacidade fotossintética, pode estimular uma produção excessiva de etileno, que causa queda prematura de folhas e frutos, provocar alterações no aspecto do fruto, seca de ramos novos e, em casos raros de alta incidência da doença, morte da planta (BROWN, 2001). As principais consequências do cancro cítrico em áreas onde a doença é endêmica são desfolha de plantas, queda prematura de frutos e depreciação da produção (BEHLAU; BELASQUE JR, 2014).

A *Xac* pode ser disseminada pela ação do homem, por meio de trânsito de mudas, material de colheita, implementos e veículos contaminados, e também pela ação da natureza, por meio de chuvas acompanhada de ventos, onde os inóculos presentes nas gotas são depositados no tecido do hospedeiro, entrando no mesmo por meio de feridas e estômatos abertos. A presença de galerias nas folhas causadas pelo minador dos citros (*Phyllocnistis citrella*) aumenta a incidência e a severidade da doença nos pomares. A bactéria é capaz de nadar distâncias curtas, devido a presença de flagelo (BEHLAU; BELASQUE JR, 2014; FERENGE et al., 2017).

Não existem variedades ou espécies de uso comercial de citros que sejam completamente resistentes a doença. Além disso, ainda não há controle químico adequado para o cancro cítrico. Até o ano de 2013, o controle empregado era erradicação das plantas situadas em um raio de 30 metros da planta contaminada (FUNDECITRUS, 2008). Em 2013, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do

estado de São Paulo publicou no Diário Oficial do Estado de 1 de novembro de 2013, a Resolução SAA – 147, que modificou o método de controle, que passou a indicar a eliminação apenas da planta contaminada e a pulverização com cobre no raio de 30 metros, a qual deve ser repetida a cada brotação. Além disso, os citricultores devem realizar inspeções trimestrais nos pomares (FUNDECITRUS, 2013). No entanto, de acordo com a nova legislação federal, Instrução Normativa nº. 37 de 05/09/2016 (IN 37), as estratégias de controle do cancro cítrico a serem adotadas dependem do status fitossanitário da doença na área, que pode ser quatro: área com praga ausente, área livre da praga (ALP), área sob erradicação ou supressão e área sob sistema de mitigação de risco (SMR). No estado de São Paulo, conforme determinado pela Resolução da Secretaria de Agricultura e Abastecimento nº. 10 de 20/02/2017 (Resolução SAA 10), a estratégia de controle oficial adotada a partir de 2017 é o SMR, área onde o cancro cítrico está amplamente distribuído entre as plantas em estado onde a doença está presente. A mitigação de risco permitirá ao citricultor manter as plantas com sintomas de cancro cítrico em seus pomares, porém torna-se necessário a adoção de medidas integradas de manejo que visam a minimização tanto das perdas provocadas pela doença no campo e em casas de beneficiamento de frutos como dos riscos de comercialização de frutos com sintomas da doença. De modo geral, o controle do cancro cítrico deve ser realizado pelo plantio de mudas saudáveis, uso de variedades menos suscetíveis à doença, aplicação de bactericidas à base de cobre, plantio de quebra-ventos, controle do minador de citros, desinfestação de máquinas e ferramentas (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017). Os níveis de resistência e suscetibilidade das espécies e variedades de citros podem ser observados na Figura 1.

NÍVEL DE RESISTÊNCIA	VARIEDADE/ESPÉCIE
Altamente resistente	Calamondim, Kumquat
Resistente	Tangerinas Ponkan, Satsuma, Cleopatra, Sunki
Moderadamente resistente	Laranja Folha Murcha, lima ácida Tahiti, Mexerica do Rio
Moderadamente suscetível	Laranjas Pera, Valência, Iapar 73, Tangerinas Clementina, Dancy, Cravo, Tangor Murcott
Suscetível	Laranjas Hamlin, Westin, Rubi, Seleta Vermelha, Pineapple, Baía, Baianinha, Navelina, Natal
Altamente suscetível	Pomelo (<i>Grapefruit</i>), lima ácida Galego, limões verdadeiros

Figura 1. Escala de tolerância e suscetibilidade das espécies e variedades comerciais de citros que podem ser afetadas pelo cancro cítrico (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2017).

2.3 Caracterização das ORFs XAC2361 e XAC3898

O sequenciamento do genoma da *Xac306* realizado por da Silva et al. (2002) revelou a presença de nove ORFs (Open Read Frames) que possuem domínio Peptidase_M23, sendo elas: XAC0024, XAC0466, XAC0787, XAC1728, XAC2361, XAC2928, XAC3041, XAC3368 e XAC3898. O domínio Peptidase_M23 é amplamente encontrado em bactérias. Muitas proteínas dessa família possuem um íon de zinco no seu domínio catalítico, o que contribui para a sua atividade de protease (OKUMURA et al., 2013).

O domínio Peptidase_M23 é predito ser um domínio de hidrolase da parede celular, no entanto sua função ainda não é totalmente esclarecida. Sabe-se que esse domínio possui atividade hidrolítica, o que lhe permite realizar a digestão da ligação Gly-Gly, atuando sobre o peptidoglicano (SUDIARTA; FUKUSHIMA; SEKIGUCHI, 2010). Além disso, todas as ORFs (exceto XAC0024) apresentam um domínio NlpD. Em *Escherichia coli* o gene *nlpD* codifica uma lipoproteína que possui função

hidrolítica na formação e manutenção da membrana celular (TIDHAR et al., 2009). NlpD é uma lipoproteína da membrana externa que consiste em múltiplos domínios: um motivo de lisina (domínio LysM), um domínio dLytM e duas regiões linker, uma no N terminal e outra entre os domínios LysM e dLytM. Atuando como um importante mediador, ligando a remodelação da parede celular e a invaginação da membrana externa ao sítio de divisão das bactérias gram-negativas, destacando-se como um alvo potencial para agentes que quebram o envelope celular (TSANG; YAKHNINA; BERNHARDT, 2017).

As ORFs XAC2361 e XAC3898 foram eleitas para estudos mais aprofundados na tentativa de melhor compreender suas funções e seus possíveis papéis nas interações da bactéria com o hospedeiro. A ORF XAC3898, além do domínio Peptidase_M23, também possui o domínio OapA. Membros dessa família são proteínas associadas à opacidade, que inclui a proteína associada à opacidade de *Haemophilus influenzae*, necessária para a colonização eficiente da mucosa nasofaríngea e sua expressão está associada ao aspecto transparente da colônia, possivelmente são proteínas secretadas. Este domínio pertence a superfamília LysM (NCBI, 2017). O domínio LysM é um dos mais comuns nas proteínas da superfície celular bacteriana, está em mais de 100 proteínas, ocorrendo mais frequentemente em enzimas que degradam a parede celular, onde provavelmente atua ancorando os domínios catalíticos aos seus substratos, além de ser encontrado em proteínas relacionadas a patogênese e também possui função relacionada ao reconhecimento de polímeros de carboidratos (BATEMAN; BYCROFT, 2000; BAMFORD et al., 2010).

A ORF XAC2361 codifica uma proteína com 280 aminoácidos, enquanto que a proteína codificada pela ORF XAC3898 possui 472 aminoácidos. O tamanho das proteínas, assim como os domínios presentes podem ser observados na Figura 2.

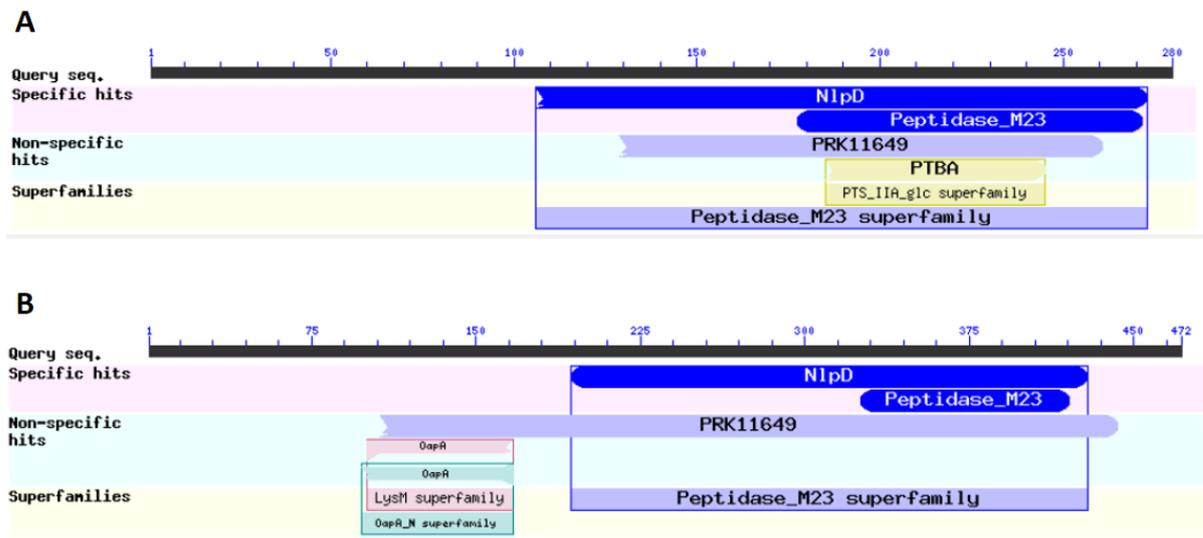


Figura 2. Domínios apresentados pelas proteínas codificadas pelas ORFs XAC2361 e XAC3898 quando analisadas *in silico* (Blastp do NCBI). A) XAC2361, com 280 aminoácidos B) XAC3898, com 472 aminoácidos. O Domínio Peptidase_M23 de cada uma delas é mostrado (NCBI, 2017).

Em células procarióticas e eucarióticas, proteínas podem entrar na via secretora somente se estiverem dotadas de um peptídeo sinal (HEIJNE, 1990). Para que o processo de infecção de plantas hospedeiras ocorra com sucesso, muitas bactérias secretam proteínas por meio de sistemas de secreção, para o meio extracelular ou diretamente para o citosol da célula hospedeira, tais proteínas são designadas proteínas efetoras. Vários patógenos usam uma combinação de diferentes sistemas de secreção de proteínas para garantir multiplicação bacteriana eficiente e progressão da doença (BÜTTNER; BONAS, 2010).

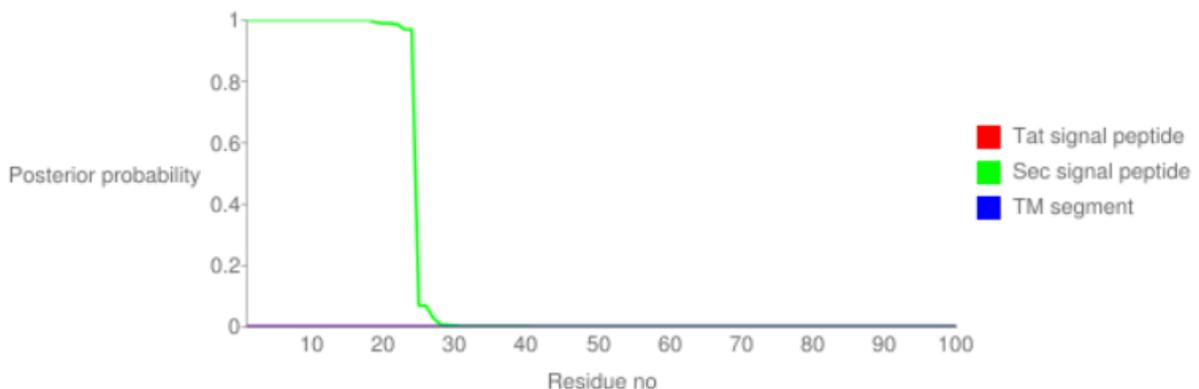
Os sistemas de secreção são classificados em sete tipos até o momento, do tipo I ao tipo VII, de acordo com a sua composição, função e substratos, sendo que o sistema de secreção do tipo VII é específico de bactérias Gram-positivas, já os outros seis sistemas de secreção (do tipo I ao tipo VI) são encontrados em bactérias Gram-negativas, inclusive na *Xac*, embora nem todos os sistemas de secreção tenham sido bem estudados neste patógeno (GUO, 2011).

Em bactérias Gram-negativas, algumas proteínas secretadas são exportadas através das membranas interna e externa em um único passo através dos sistemas de secreção tipo I, tipo III, tipo IV ou tipo VI. Enquanto que, outras proteínas são exportadas primeiramente para o periplasma por meio da via de secreção geral (Sec) ou da via da arginina dupla (Tat), para então, serem translocadas para o exterior

membrana via sistema de secreção tipos II e V ou, menos comumente, pelos sistemas tipo I e IV (TSENG; TYLER; SETUBAL, 2009).

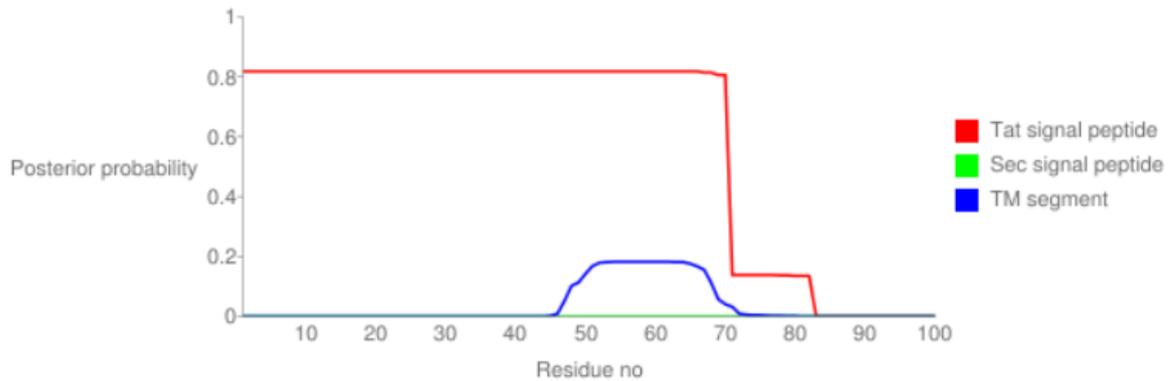
O sistema Sec está envolvido tanto na secreção de proteínas desdobradas através da membrana citoplasmática, quanto na inserção de proteínas de membrana ara dentro membrana citoplasmática. Enquanto que, o sistema Tat está envolvido na secreção de proteínas dobradas e de proteínas contendo cofatores. Embora as vias Tat e Sec realizem a translocação de proteínas por mecanismos fundamentalmente diferentes, muitos elementos comuns podem ser reconhecidos (NATALE; BRÜSER; DRIESSEN, 2008).

A ORF XAC2361 apresenta peptídeo sinal Sec formado pelos primeiros 24 aminoácidos, enquanto que a ORF XAC3898 possui peptídeo sinal Tat formado pelos 70 primeiros aminoácidos, ambos preditos pelo programa PRED-TAT (BAGOS et al., 2010), como pode ser observado na Figuras 3 e 4.



Sec signal peptide predicted. Most likely cleavage site: 1 - 24 [ADA-QS]

Figura 3. Resultado da busca de presença dos peptídeos sinais Sec e Tat na ORF XAC2361 no programa PRED-TAT (BAGOS et al., 2010). O programa prediz um peptídeo sinal Sec formado pelos primeiros 24 aminoácidos, com sítio de clivagem entre os aminoácidos 24 e 25 (...ADA ↓ QS...).



Tat signal peptide predicted. Most likely cleavage site: 1 - 70 [SNA-ID]

Figura 4. Resultado da busca de presença dos peptídeos sinais Sec e Tat na ORF XAC3898 no programa PRED-TAT (BAGOS et al., 2010). O programa prediz um peptídeo sinal Tat formado pelos primeiros 70 aminoácidos, com sítio de clivagem entre os aminoácidos 70 e 71 (...SNA ↓ ID...).

2.4 Mutação sítio-dirigida como ferramenta no nocaute gênico

A mutagênese sítio-dirigida é uma poderosa ferramenta para a produção de mutantes e na tecnologia de DNA recombinante, visando avaliar a função de genes em um dado organismo e de resíduos específicos de aminoácidos na estrutura e função de proteínas, além de facilitar a geração de novos produtos de genes. Uma variedade de protocolos tem sido estabelecidos para alcançar a mutagênese eficiente, incluindo vários que utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR) (HO et al, 1989; SAWANO; MIYAWAKI, 2000). A mutagênese sítio-dirigida por PCR de extensão por sobreposição permite a obtenção de mutantes por meio de inserções de nucleotídeos únicos ou múltiplos, deleções ou substituições, utilizando oligonucleotídeos iniciadores que introduzem a modificação desejada (HECKMAN; PEASE, 2007).

O protocolo de mutagênese sítio-dirigida por PCR de extensão por sobreposição descrito por Lee et al. (2004) permite a obtenção de mutantes localizados com precisão com qualquer comprimento de inserção ou deleção. O método consiste na deleção ou inserção de um fragmento de DNA em duas etapas de PCR: uma PCR primária, na qual são realizadas duas PCRs independentes,

empregando os pares de oligonucleotídeos A-B e C-D. Os dois fragmentos obtidos são utilizados como molde na segunda PCR, a de ligação, na qual são utilizados os oligonucleotídeos A-D. Na PCR de ligação ou PCR de extensão por sobreposição, os fragmentos A-B e C-D são unidos por meio das caudas complementares, formando o fragmento A-D com a região de interesse deletada (Figura 5).

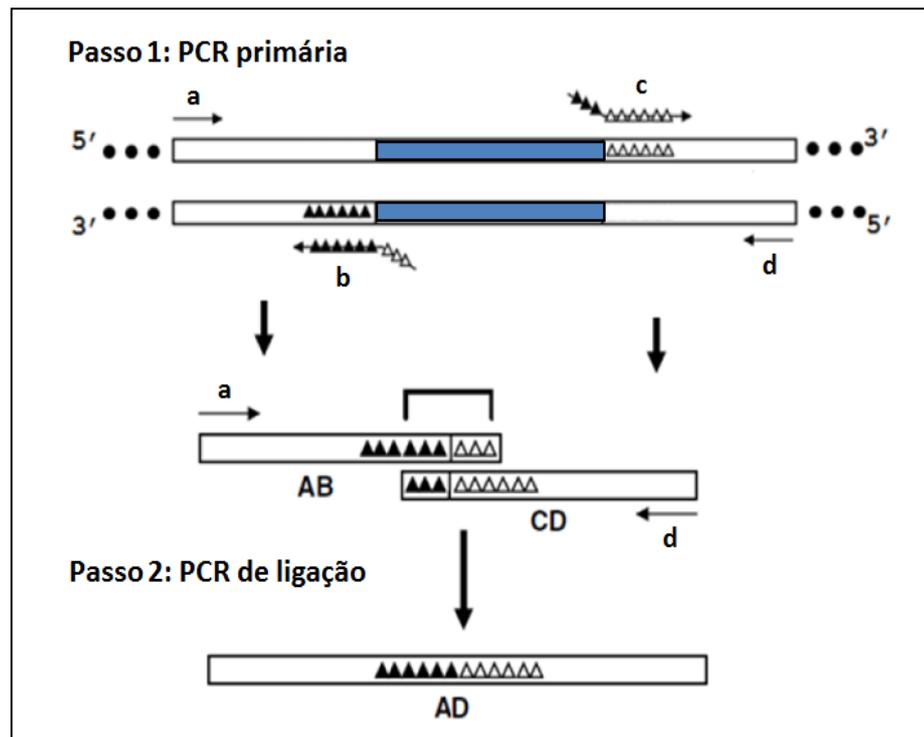


Figura 5. Mutação sítio dirigida por deleção. Adaptado de LEE et al. (2004) por Martins (2016). A região azul corresponde ao gene a ser deletado total ou parcialmente.

Para essa técnica é necessário a síntese de quatro oligonucleotídeos: dois quiméricos (B e C) localizados internamente ao fragmento que se pretende deletar, e dois não quiméricos (A e D) localizados periféricamente ao mesmo fragmento. Os oligonucleotídeos quiméricos devem conter de 18 a 21 nucleotídeos (nt) derivados das sequências da fita molde e 9 nt a partir do fragmento a ser recombinado, que formam a cauda complementar. Enquanto que os oligonucleotídeos não quiméricos, podem incluir locais de restrição nas extremidades para facilitar a clonagem subsequente do produto de PCR ligado (LEE et al., 2004).

Após a obtenção do fragmento desejado, este deve ser inserido em vetor plasmidial do tipo suicida, para que quando inserido na célula a ser modificada, ocorra a permutação de alelos por recombinação homóloga. A recombinação homóloga (RH) ocorre naturalmente em organismos procariotos e eucariotos, e utiliza a região

homóloga do DNA do doador como um modelo para reparar a quebra no DNA. O processo de reparação por RH é aplicável na geração de mutação sítio-dirigida de uma sequência específica do DNA, por meio da substituição da sequência ou para integrar precisamente genes de interesse, como marcadores fluorescentes em locais alvo para vários fins de pesquisa e aplicação (LI et al., 2016).

O vetor suicida pNPTS138, derivado do vetor pLITMUS38, contém o gene de resistência à canamicina e o gene de suscetibilidade a levansucrase *sacB* (Figura 6), além de apresentar a capacidade de se transferir por conjugação para uma grande diversidade de bactérias (Dickon Alley M.R.K., dados não publicados). O pNPTS138 tem sido utilizado em diversos trabalhos de nocaute gênico, ou seja, deleção de genes de interesse por recombinação homóloga (CAPPELLETTI, 2010; LACERDA, 2015; LESLEY; SHAPIRO, 2008; WANG et al., 2006).

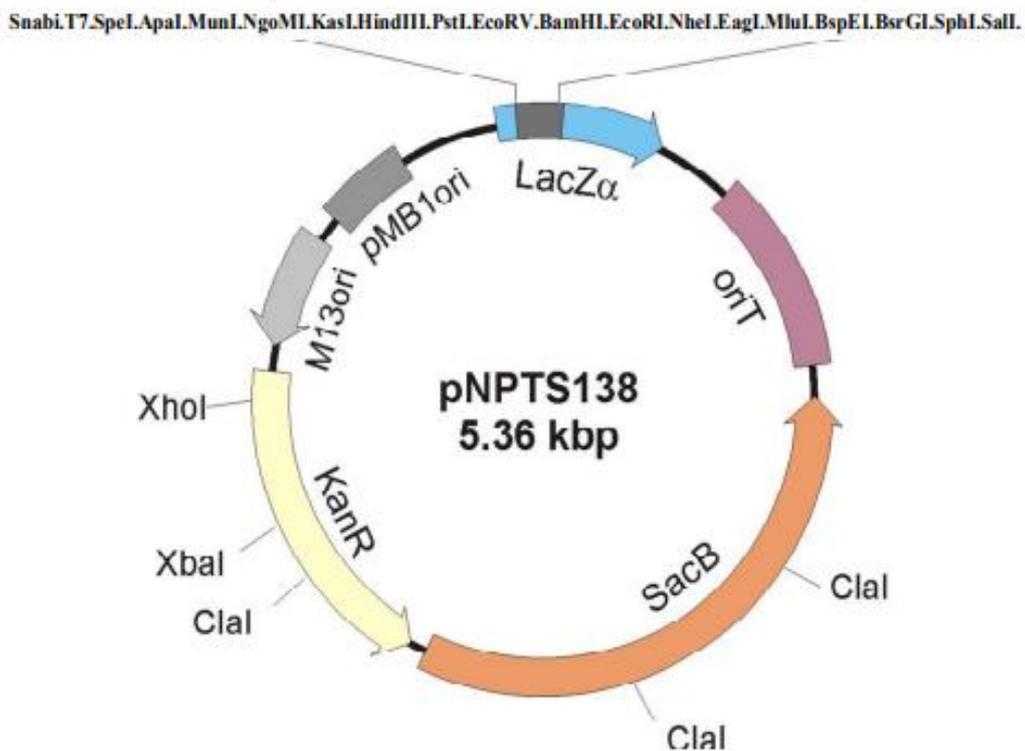


Figura 6. Mapa do vetor suicida pNPTS138 (Dickon Alley M.R.K., dados não publicados), adaptado de (CAPPELLETTI, 2010).

2.5 Microscopia de fluorescência na localização de proteínas

A investigação da localização das proteínas no nível subcelular permite a melhor compreensão de função das proteínas, redes de interação e vias de sinalização celular. As técnicas baseadas em imagem possibilitam a observação da localização espacial da proteína *in situ* a partir de uma única célula e pode efetivamente esclarecer a questão das proteínas que se localizam em várias organelas. Uma das técnicas para identificar a localização subcelular de proteínas é a expressão da proteína alvo fundida a uma proteína fluorescente (PF) (STADLER et al., 2013).

Lorenzoni et al. (2017) expressaram a proteína de fusão GFP-MinC, utilizando o vetor integrativo pGCD21, derivado do vetor pHF5Ca, que permite a expressão de proteínas de fusão com o GFP em *Xac*, sob o controle do promotor arabinose. O pGCD21 é um vetor integrativo (integra no locus *amy* de *Xac306*), apresenta resistência aos antibióticos canamicina e ampicilina/carbenicilina e possui o gene da proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) sob controle do promotor arabinose. Este vetor possibilita a fusão de proteínas de interesse à GFP para estudos funcionais.

Por sua vez, o vetor pMAJ1 (PENA, M. M., não publicado) foi construído a partir do vetor pGCD21, o qual foi digerido com as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI*, para a remoção do gene que codifica a proteína GFP, sendo então substituído pelo gene da proteína fluorescente mCherry, que emite fluorescência vermelha, permitindo verificar o direcionamento de uma dada proteína na célula, inclusive no periplasma da bactéria, o que torna seu uso interessante para proteínas que apresentam peptídeo sinal. O mapa do vetor pMAJ1 pode ser observado na figura 7.

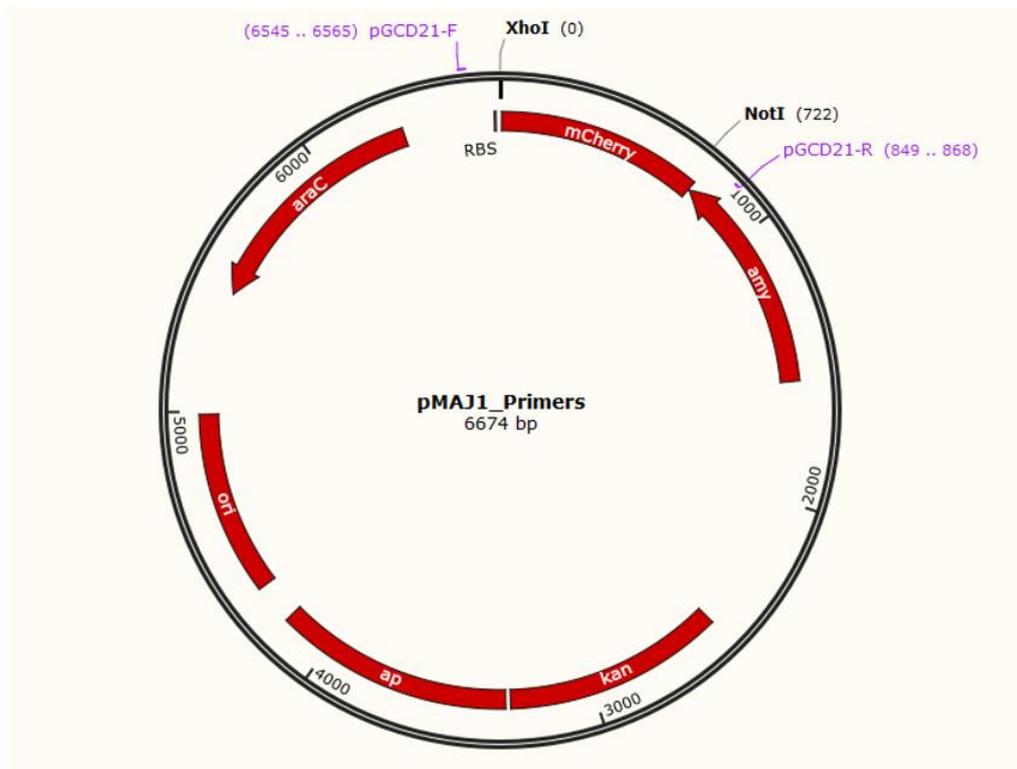


Figura 7. Mapa do vetor pMAJ1 construído por (PENA, M. M., não publicado)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar, por meio da mutação sítio-dirigida por deleção parcial, se as ORFs XAC2361 e XAC3898 estão relacionadas com a virulência e/ou patogenicidade de *X. citri* subsp. *citri* 306 e com o desenvolvimento do cancro cítrico.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar mutação sítio-dirigida das ORFs XAC2361 e XAC3898;
- Verificar se a mutação afeta os sintomas do cancro cítrico através da inoculação de plantas de limão cravo;
- Realizar análises fenotípicas *in vitro* e *in planta*;
- Analisar por meio de microscopia eletrônica de varredura possíveis alterações no formato e tamanho das células;
- Clonar a ORF XAC2361 em vetor contendo mCherry de modo a obter a proteína de fusão XAC2361-mCherry;
- Analisar, por microscopia de fluorescência, a localização da proteína de fusão XAC2361-mCherry.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos DNAs das ORFs XAC2361 e XAC3898

Os clones OSC03 (cosmídeo) e AOUE9829D08 (plasmídeo), oriundos das bibliotecas produzidas para o sequenciamento completo do genoma da *Xac306* (DA SILVA et al., 2002), os quais contêm as ORFs XAC2361 e XAC3898, respectivamente, foram obtidos no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da FCAV/UNESP, onde os mesmos encontravam-se armazenados a -80°C.

As bactérias contendo os clones de interesse foram plaqueadas em meio de cultura sólido LB (Luria-Bertani: 10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio e 15 g de ágar, H₂O q.s.p. 1 L, pH 7,0) e antibiótico adequado (canamicina - 50 µg/mL ou ampicilina - 50 µg/mL) e, incubadas a 37°C por 16 h em estufa bacteriológica. Após o crescimento, uma colônia isolada de cada clone foi coletada e transferida para tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de meio de cultura líquido LB, contendo antibiótico adequado, e em seguida os inóculos foram incubados a 37°C por 16 h sob agitação de 200 rpm. Os DNAs cosmidial e plasmidial foram extraídos e purificados utilizando o Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as instruções do fabricante e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

4.2 Mutação sítio-dirigida das ORFs XAC2361 e XAC3898

4.2.1 Desenho dos oligonucleotídeos

Para a deleção parcial das ORFs XAC2361 e XAC3898, que contêm 843 pb e 1419 pb respectivamente, foi realizada a técnica de mutação sítio-dirigida por PCR de extensão por sobreposição, a qual consiste na deleção de um fragmento de DNA em duas etapas: uma PCR primária e uma PCR secundária ou de ligação (LEE et al., 2004). Para isso, foram desenhados quatro oligonucleotídeos (A, B, C e D) para cada ORF (Tabelas 1 e 2), a partir das respectivas sequências de nucleotídeos (Figuras 8 e 9), localizadas na base de dados *Genbank do The National Center for Biotechnology Information - NCBI*. Os oligonucleotídeos foram desenhados de acordo com Lee et al.

(2004) e os oligonucleotídeos B e C possuem caudas com sequências complementares, permitindo que os fragmentos A-B e C-D se anelem. Quando os fragmentos A-B e C-D são anelados e amplificados com os oligonucleotídeos A e D (PCR de ligação), obtém-se o fragmento C-D sem a região do gene que se quer deletar. Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados pela SIGMA-ALDRICH BRASIL LTDA.

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos para obtenção do mutante da ORF XAC2361 (os oligonucleotídeos A e D foram desenhados com os sítios das enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, respectivamente).

Nome do produto	Nome do Oligonucleotídeo	Sequencia 5' => 3'	Amplicon (pb)
Fragmento A-B	XAC2361.A (F)*	AAAGGATCCATGCGCGCAGTCCTGTTT	359
	XAC2361.B (R)*	CCTGGCCTTGGGTTGACCGTCTTGGGC	
Fragmento C-D	XAC2361.C (F)*	GGTCAACCC AAGGCCAGGTGATTGCCG	298
	XAC2361.D (R)*	AAAGAATTCCGCCTGCATTGCTATCCACTG	
Fragmento A-D	XAC2361.A (F)*	AAAGGATCCATGCGCGCAGTCCTGTTT	657
	XAC2361.D (R)*	AAAGAATTCCGCCTGCATTGCTATCCACTG	

(F): Sequência do oligonucleotídeo direto (Forward); (R): Sequência do oligonucleotídeo reverso (Reverse).

As sequências em vermelho dos oligonucleotídeos B e C correspondem às caudas complementares das sequências em azul (regiões complementares) dos oligonucleotídeos B e C nas quais se ligarão.

Sítio de restrição da enzima *Bam*HI em roxo.

Sítio de restrição da enzima *Eco*RI em verde.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção do mutante da ORF XAC3898.

Nome do produto	Nome do Oligonucleotídeo	Sequencia 5' => 3'	Amplicon (pb)
Fragmento A-B	XAC3898_A (F)	ATGCAGAACTCAGAGCAGGGC	490
	XAC3898_B (R)	CTTGCCAAACGAAGCGCAATGCGCGCAGTT	
Fragmento C-D	XAC3898_C (F)	TGCGCTTCGTTTGGCAAGATCAAGGCCGGG	285
	XAC3898_D (R)	TCAACTGCGCGACTTGCCCTT	
Fragmento A-D	XAC3898_A (F)	ATGCAGAACTCAGAGCAGGGC	775
	XAC3898_D (R)	TCAACTGCGCGACTTGCCCTT	

(F): Sequência do oligonucleotídeo direto (Forward); (R): Sequência do oligonucleotídeo reverso (Reverse).

As sequências em vermelho dos oligonucleotídeos B e C correspondem às caudas complementares das sequências em azul (regiões complementares) dos oligonucleotídeos B e C nas quais se ligarão.

```
>NC_003919.1:2755651-2756493 Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306,
complete genome
ATGCGCGCAGTCCTGTTTGGCGCCTGGTTGATCCTGGCGCCAGTCGCGCTGGTTGCAGGACGCGCCGA
TGCGCAGAGTGCGGCCGTCGCAACTGATGTCGTGTTTCCGCAAAGCGCTTCGCAAGGTGCGCTGGTAA
TCGGCAAGGTGCCGGCTGATAGCAAGGTGCAATACGCCGGCCGAGCTTGCCTGTGAGCGGTTATGGA
AGCGTCGTGTTCCGGTATCGGCCGCGATGCGACCGGGCCTTTGCAGGTGCAGGTCAACCAACCCGATGG
CAGCACGCGGACCGTGAGCATCGCAGTGACGCCGCGGACTGGCCGGTGGAAACGCGTCAATGGCGTGC
CGCCAAAGACGGTCAACCCGCCGGCCGAGATTGCTGCGCGCATCAAACGCGAACAGGCGCAGGTACAG
GCGGCGCGCGACCGCGATGACGCACGCACCGATTTCCGCCAACCTTCATCTGGCCGGTGCAGGGACG
CATCAGCGGCCGCTTCGGCAATGCACGCGTGTACAACGGCCAGCCGGCGCCGGCCATTCGGGCATGG
ACATCGCCGTACCCACCGGCACTCCGGTGAAGGCACCGGCTGCCGGCGTGGTGCAGTTCGCGGGCGCCG
GACCTGTATCTCACCGGTGGCACGGTGTGCTGGATCACGGCTTCGGGGTAAGCTCGAATTTCTGCA
CTTGTGCGGTATCGACGTGAAGGTGGGCGACCGGTCGAGCAAGGCCAGGTGATTGCCGCGGTTGGTG
CCACCGGGCGCGCCACGGGGCCGCATCTGCATTGGGGGATGAATTGGTTTCGACACCCGCATCGATCCG
TTGCTGGTGTGTTGAGCGGACGAAGTAGAGCGTTCGAAAGATCGCCTCTTTGACGCGCGGTGGCATGGA
AGACGCTGTTATACGCTTCCTGTAAGAGCCTGCTTGGCCAGCCCGGTCTTCTGCTGACTCGAGTTCCG
CTCACACAAATTATCGCGTCTCGGACGTACTGGAACGGAGCCGCAAAGTGGATAGCAATGCAGGGCG
```

Figura 8. Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC2361 obtida através *Genbank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As letras vermelhas indicam a região intergênica. A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas e indicadas pelas cores amarelo, vermelho, azul e lilás, respectivamente.

```
>gi|21240774:4583700-4585118 Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306,
complete genome
ATGCAGAACTCAGAGCAGGGCCGTGCACGCAAGCGGCGCTTTCACGAACGCCTCCACGTCTCCACGA
CACTGCACTGCATCGAAAGCTCAAGGCGCATCTGCCGGCGGCATTC AATGACCGCTGGACACGTGCGC
ACTGGATCCACGCCAGCCTGTTTCGCCACCATCGGCGCGCTGGTGGCCACGATCGTGCCGGGTTTTTCC
AACGCCATCGACACACCGCTTTCAGCCATTCCACGCTGGCGTTGCCGTTGCCGCCGCTGATTCCAG
CCGCAAGCAGCTGGCGCCGAGCACCGATTGGGAAATTCTGCAGGTCAAGCCGGGCCAGACGCTGAGTA
CCTTGTTCGGCGAGCTGGGAATCCCGACCACGGTGTGTACCAGGTATTGGCGCATCCGGGGACCAAG
GAGGTGCTGACCAAGCTGCGTCCGGGCACCGAGATCGCCTTCGACATGCCGACGCGCGGGCAACTGCG
CGCATTGCGCTTCGATCGCGACGACAGTCATCGGGTGGAACTGCGCCTGCTGGGCGACGCCGTGCGCG
AGAACGTGACCGAGCGGGCGACCACCACGCGCACAGTGGTTGCCAGCGGGGAGATCAGCAGTTCGTTG
TATGCATCGGCCGCAATCCGGATTGTCGCCGGCGGGCGGTGGCGATCATGACCGACGAGATCTTCAA
GTACGACATCGACTTCGACAAGGATCTGCAGCCCGGCGACCGTTTCAGCGTGGTTCATGGATGAAACCT
GGCGCGAAGGCGAGCGGATCAGCACCGGCGACATCCTGGCGGCGACGTTACCACCGGCGGCAAGACC
TATACGGGGTTTTCGCTTCGAGCGTGCCGGCAAACCGGCCGAGTACTTCGACATCAATGGCCGCCGCT
CAAGAAGAGCTTTATCCGCATGCCGGTGGCCTATAGCCGGATCAGCTCCACCTTCGGTGC GCGCAAGC
ATCCGGTGTGTTGGCACCATGCGCATGCACAAGGGTGTGGACTATGCGGCCGCTCGGGCACGCCGATC
ATGGCAGCCGGCGATGCGCGGGTGGTGTGTTGTCGGGACCCAACGCGGTTATGGCAACGTGGTGATCCT
GGATCACGGCAAGAACTACAGCACGCTGTACGGGCACATGTCGCGCTTTGGCAAGATCAAGGCCGGC
AGCGCATCAACCAGGGCACGGTGTGATCGGCTATGTCGGCATGACCGGCCTGGCGACCGGCCCGCATCTG
CATTACGAATTCCGCGTGGGCGGACAGCAGCGCAATCCGATGTCGGTGACGATGCCGCCCGGAGCC
GCTGCAGGGCGTCAACTGGCGGCTTCCGCGCGCAGACGGCGCCGGCCATGGCTCGCATCGAGGGCA
TGGAGAAGCTGATCTACGCCGACGCCGGCAAGCCGGCC AAGGGCAAGTCGCGCAGTTGA
```

Figura 9. Sequência de nucleotídeos em formato FASTA da ORF XAC3898 obtida através *Genbank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A região dos oligonucleotídeos A, B, C e D estão destacadas e indicadas pelas cores vermelho, amarelo, verde e azul, respectivamente.

4.2.2 Obtenção e purificação dos fragmentos A-B, C-D e A-D das ORFs XAC2361 e XAC3898

As reações de PCR para a obtenção dos fragmentos AB e CD das ORFs XAC2361 e XAC3898 foram realizadas separadamente no volume final de 50µL. Cada reação continha 20 ng de DNA cosmidial ou plasmidial, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), 1X do tampão da enzima, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabelas 1 e 2), 3% de DMSO (Dimetilsulfóxido) e água ultrapura estéril. A PCR primária dos segmentos A-B e C-D, foi realizada utilizando o termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (AB Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 98°C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 98°C por 10 seg, 68°C por 15 seg e 72°C por 30 seg, e uma extensão final a 72°C por 10 min. A amplificação dos fragmentos esperados foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 10 µg/mL de brometo de etídeo, com o tampão de corrida TBE (Tris-Borate-EDTA: 54 g Tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0 para 1 L) a 0,5X a 3 V/cm. Os fragmentos amplificados foram visualizados e documentados por fotografia no transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (BIORAD). Os fragmentos A-B e C-D de cada ORF foram purificados a partir dos produtos de PCR utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific). Os fragmentos A-B e C-D purificados, foram utilizados como molde na PCR de ligação, seguindo o mesmo protocolo utilizado na PCR primária, porém, utilizou-se os oligonucleotídeos A e D (Tabelas 1 e 2), e 20 ng de cada DNA purificado, em um volume final de 50 µL. A amplificação dos fragmentos A-D foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% e a bandas correspondentes ao tamanho dos amplicons esperados foram cortadas do gel e purificadas utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific). Os diagramas esquemáticos de como foram realizadas as deleções parciais das ORFs XAC2361 e XAC3898 são apresentados nas figuras 10 e 11, respectivamente. O gel de agarose confirma que os fragmentos A-B, C-D e A-D de cada ORF apresentaram os tamanhos de bandas esperados (Figura 12).

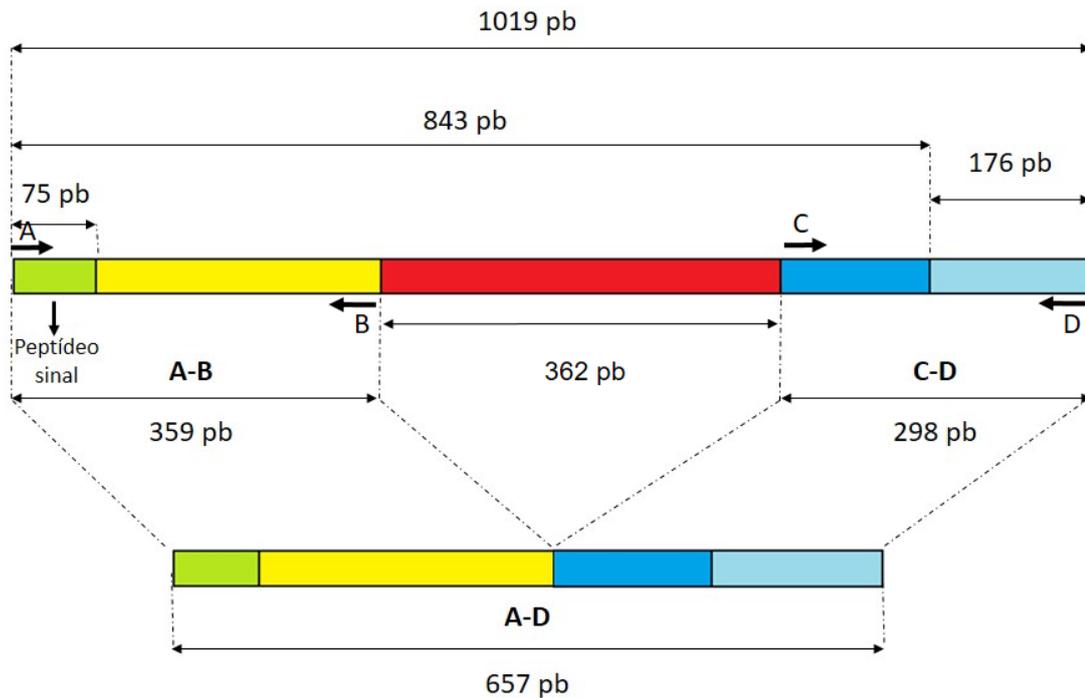


Figura 10. Diagrama esquemático da deleção parcial da ORF XAC2361, demonstrando a posição dos primers A, B, C e D, além do peptídeo sinal e de parte da região intergênica em azul claro, a região em vermelho foi deletada.

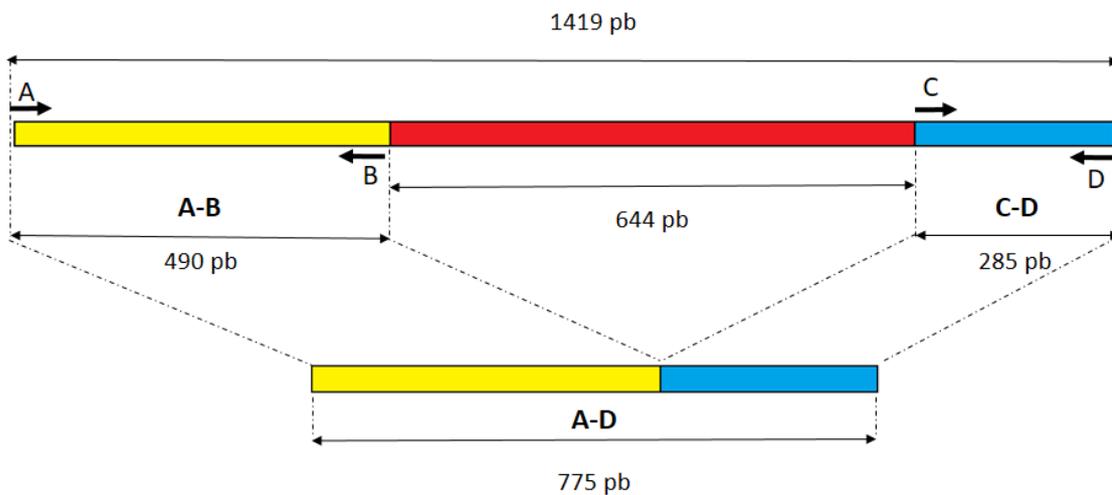


Figura 11. Diagrama esquemático da deleção parcial da ORF XAC3898, demonstrando a posição dos primers A, B, C e D, a região em vermelho foi deletada.

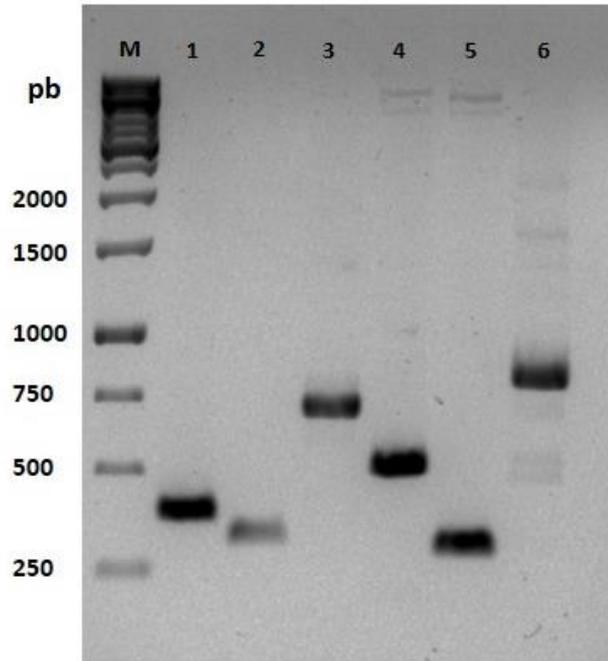


Figura 12. Gel de agarose demonstrando os fragmentos A-B, C-D e A-D das ORFs XAC2361 e XAC3898 obtidos por meio de PCR e purificados. 1 a 3: ORF XAC2361. 1) A-B (359 pb), 2) C-D (298 pb), 3) A-D (657 pb). 4 a 6: ORF XAC3898. 4) A-B (490 pb), 5) C-D (285 pb), 6) A-D (775 pb), M: marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 µg/mL).

4.2.3 Preparo de células de *E. coli* DH10B quimicamente competentes

As células de *E. coli* DH10B quimicamente competentes foram preparadas de acordo com Sambrook, Fritschi e Maniatis (1989), com modificações. Inicialmente foi feito um pré-inóculo a partir de uma colônia isolada de *E. coli* DH10B em 5 mL de meio líquido LB, incubado por 16 h a 37°C e 200 rpm. Após a incubação foram transferidos 3 mL do pré-inóculo para um erlenmeyer contendo 300 mL de meio líquido LB, incubado a 37°C e 250 rpm, até atingir a $DO_{600nm} = 0,4$ a $0,6$, em seguida foi deixado em banho de gelo por 30 min. A suspensão bacteriana foi transferida para tubos tipo falcon de 50 mL e centrifugados a 4°C por 12 min a 4000 g, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* de cada tubo foram ressuspensos em 10 mL da solução de $CaCl_2$ 0,1M + glicerol 20% gelada e centrifugados novamente e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* foram ressuspensos, agrupados em um único tubo e o volume completado com a solução de $CaCl_2$ 0,1M + glicerol 20% gelada para o volume final de 2,5 mL, em seguida foram aliquotados 50 µL em microtubos de 1,5 mL. Por fim, congelados rapidamente em Nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

4.2.4 Clonagem do fragmento A-D da ORF XAC3898 em vetor pGEM®-T Easy e transformação em *E. coli* DH10B quimicamente competente

O fragmento A-D que possui a ORF XAC3898 deletada não possui sítios para endonucleases e, portanto, foi clonado no vetor pGEM®-T Easy (Promega). Para tanto, foi realizada a adenilação do fragmento, necessária para que o mesmo se liguem ao vetor, o qual possui Timina nas extremidades. Para esta etapa, foram adicionados em um microtubo com capacidade 200 µL: 500 ng de fragmento A-D da ORF XAC3898, 1 U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase recombinant (Invitrogen), 1X do tampão da enzima, 0,5 mM de dATP e água ultrapura estéril, para uma reação de 20 µL e o microtubo foi mantido a 72°C por 10 min no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Em seguida, o fragmento foi ligado no vetor pGEM-T-Easy, segundo recomendação do fabricante e essa construção foi utilizada para transformar células de *E. coli* DH10B quimicamente competentes preparadas previamente. Após a transformação, 200 µL da cultura foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura NA com 100 µg/mL de carbecilina, 0,1 mM de IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) e 0,0032% de Xgal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside), e incubadas a 37°C, por 16 h. Algumas colônias brancas foram selecionadas e o DNA plasmidial extraído utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A confirmação da presença do inserto A-D da ORF XAC3898 foi feita através de reação de PCR utilizando 20 ng de DNA plasmidial, 0,2 mM de dNTP, 1U de Go *Taq*® DNA Polymerase (Promega), 1X do tampão da enzima, 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultrapura estéril para um volume final de 20 µL. Foi utilizado o termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cyclor (AB Applied Biosystems) com o programa de desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 95°C por 30 seg, 68°C por 30 seg e 72°C por 45 seg, e uma extensão final a 72°C por 10 min. O produto da PCR foi aplicado em gel de agarose a 1% para verificação do fragmento de tamanho esperado. Os plasmídeos contendo o fragmento de tamanho esperado foram enviados para sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos T7 Promoter (direto) e Sp6 Promoter (reverso) (Tabela 3) para comprovar a clonagem do inserto de interesse e revelar a presença dos sítios das enzimas de restrição *Apal* e *Sall* do vetor pGEM®-T Easy.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento dos fragmentos A-D clonados nos vetores pGEM-T Easy e pNPTS138.

Nome do Oligonucleotídeo	Sequencia 5' => 3'
T7 Promoter (F)*	TAATACGACTCACTATAGGG
Sp6 Promoter (R)*	TTCTATAGTGTCACCTAAAT
M13 Forward -40 *	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13 Reverse -48*	AGCGGATAACAATTTACACAGGA

(F): Sequência do oligonucleotídeo direto (Forward); (R): Sequência do oligonucleotídeo reverso (Reverse).

4.2.5 Digestão da construção pGEM®-T Easy contendo o fragmento A-D da ORF XAC3898 e do vetor suicida pNPTS138 com enzimas de restrição

O vetor pNPTS138 (Dickon Alley M.R.K., dados não publicados) purificado e o plasmídeo pGEM-T-Easy (Promega) contendo o fragmento A-D da ORF XAC3898 foram digeridos utilizando as enzimas *Apal* (New England Biolabs) e *SaI* (New England Biolabs), seguindo as recomendações do fabricante. Todo o volume das digestões foi aplicado em gel de agarose low melting 0,8% e os fragmentos de interesse foram recortados do gel e purificados pelo método do fenol-clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCHI; MANIATIS, 1989).

4.2.6 Digestão do fragmento A-D da ORF XAC2361 e do vetor suicida pNPTS138 com enzimas de restrição

O fragmento A-D, que possui a ORF XAC2361 deletada, e o vetor pNPTS138 foram submetidos à digestão enzimática utilizando *Bam*HI Fast Digest (Fermentas) e *Eco*RI Fast Digest (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. A confirmação da digestão do vetor foi feita através da visualização em gel de agarose 1%. Os produtos das digestões foram purificados por meio do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

4.2.7 Clonagem em vetor suicida pNPTS138 e transformação em *E. coli* DH10B quimicamente competente

Fragmentos A-D da ORF XAC2361 contendo os sítios *Bam*HI e *Eco*RI foram ligados no vetor pNPTS138 digerido com as mesmas endonucleases. Já os fragmentos A-D da ORF XAC3898 contendo sítios de restrição *Ap*al e *Sal*I foram ligados no vetor pNPTS138 digerido com estas mesmas enzimas. As ligações foram feitas utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos das ligações foram utilizados para transformar células de *E. coli* DH10B quimicamente competentes. As células transformadas foram cultivadas em meio LB sólido, contendo canamicina (50 µg/mL), IPTG (0,1 mM) e Xgal (0,0032%), e mantidas por 16 h a 37°C. A confirmação da clonagem foi feita através da extração plasmidial de algumas colônias brancas obtidas na transformação com o inserto A-D, reações de PCR utilizando GoTaq® DNA Polymerase (como descrito anteriormente) e visualização em gel de agarose 1%. Os vetores contendo os amplicons de interesse foram enviados para sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos M13 Forward -40 e M13 Reverse -48 (Tabela 3).

4.2.8 Preparo de células eletrocompetentes de *Xac306*

As células eletrocompetentes de *Xac306* foram preparadas de acordo com o protocolo estabelecido por do Amaral et al. (2005), com modificações. Foi feito um pré-inóculo em 5 mL de meio NB (Nutrient Buffer: 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona para 1 L, pH: 6,8 - 7,0), incubado por 10 h a 29°C e 180 rpm. Em seguida foram transferidos 2 mL para um erlenmeyer contendo 200 mL de meio NB e incubadas por 16 h a 29°C e 180 rpm. A suspensão bacteriana foi transferida para tubos de 50 mL e centrifugados por 15 min a 4000 g e 25°C e o sobrenadante descartado. O *pellet* de cada tubo foi ressuscitado com 50 mL de água ultra pura estéril e centrifugados novamente, descartando o sobrenadante. Os *pellets* foram ressuscitados passando de um tubo para outro, deixando apenas dois tubos, completando para 50 mL com água ultrapura estéril e centrifugados novamente. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* reunidos em apenas um tubo, deixando apenas um filete de água. Foram distribuídos 100 µL da suspensão de células em microtubos de 1,5 mL e utilizados logo em seguida para a transformação.

4.2.9 Transformação em células eletrocompetentes de *Xac306*

Células eletrocompetentes de *Xac306* foram transformadas com as construções pNPTS138 + inserto A-D da ORF XAC2361 e pNPTS138 + inserto A-D da ORF XAC3898 de acordo com o protocolo estabelecido por do Amaral et al. (2005). Após a transformação, 200 μ L da suspensão de células foram plaqueadas em meio NA (Nutrient Agar: 3 g de extrato de carne, 5 g de peptona e 15 g de ágar bacteriológico para 1 L, pH: 6,8 - 7,0) contendo 20 μ g/mL de canamicina, e incubadas a 29°C por 72 h.

4.2.10 Seleção e confirmação dos mutantes

Após a transformação as colônias obtidas foram selecionadas conforme a metodologia proposta por Kaniga, Delor e Cornelis (1991), com modificações. Utilizando inicialmente o antibiótico canamicina (20 μ g/mL) e, em seguida selecionando as colônias transformantes em placas contendo meio de cultura NA + 5% de sacarose para que ocorra a recombinação homóloga e assim, o gene completo seja trocado pelo gene parcialmente deletado presente no vetor suicida. Após a seleção, foi extraído o DNA genômico de algumas colônias selecionadas, utilizando o Kit da Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), segundo instruções do fabricante. A confirmação dos genes deletados foi feita por meio de reações de PCR utilizando 50 ng de DNA genômico e GoTaq® DNA Polymerase (como descrito anteriormente), eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 13) e sequenciamento com os respectivos oligonucleotídeos A e D de cada ORF. Os clones contendo as deleções das ORFs XAC2361 (Δ XAC2361) e XAC3898 (Δ XAC3898) foram armazenados a -80°C em meio de cultura NB contendo 10% de glicerol e em água de torneira estéril, em temperatura ambiente.

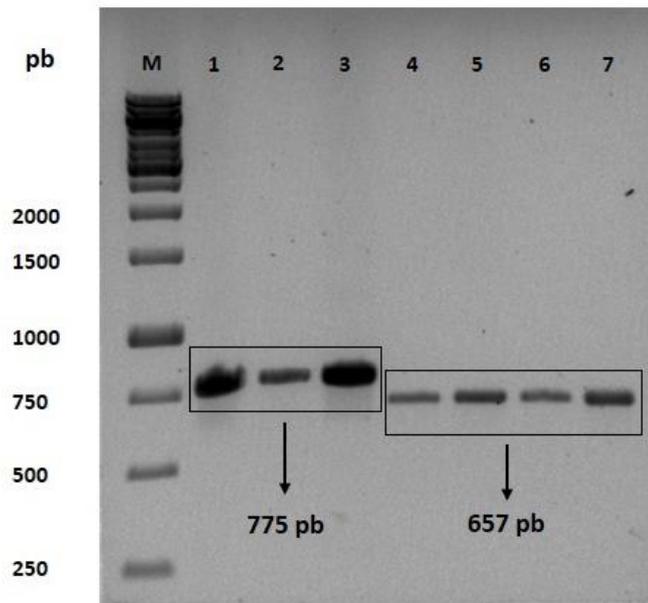


Figura 13. Gel de agarose com os produtos das PCRs dos DNAs genômicos das colônias de *Xac306* mutadas utilizando os respectivos oligonucleotídeos A e D de cada ORF. 1 a 3: colônias da ORF XAC3898 mutada (Δ XAC3898); 4 a 7: colônias da ORF XAC2361 mutada (Δ XAC2361). M: Marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas) Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 μ g/mL).

4.2.11 Confirmação da identidade da *Xac306* mutada

A confirmação da identidade da bactéria *Xac306* contendo as ORFs mutadas foi feita através de PCR utilizando o DNA genômico de quatro colônias de Δ XAC2361 e três colônias de Δ XAC3898, e os oligonucleotídeos Xac01 (5' – CGCCATCCCCACCACCACGAC - 3') e Xac02 (5' – AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA - 3') específicos para *X. citri* subsp. *citri*, (COLLETA-FILHO et al., 2006). Como controle positivo utilizou-se DNA genômico de *Xac306*, e como controle negativo DNA genômico de *XauB*, *XauC* e água ultrapura estéril. As reações de PCR foram feitas através de reação de PCR utilizando 50 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTP, 1U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), 1X do tampão da enzima, 1,5mM de MgCl₂, 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultrapura estéril para um volume final de 20 μ L. Foi utilizado o termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (AB Applied Biosystems) com o programa de desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 95°C por 30 seg, 65°C

por 30 seg e 72°C por 45 seg, e uma extensão final a 72°C por 10 min, seguida de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 14).

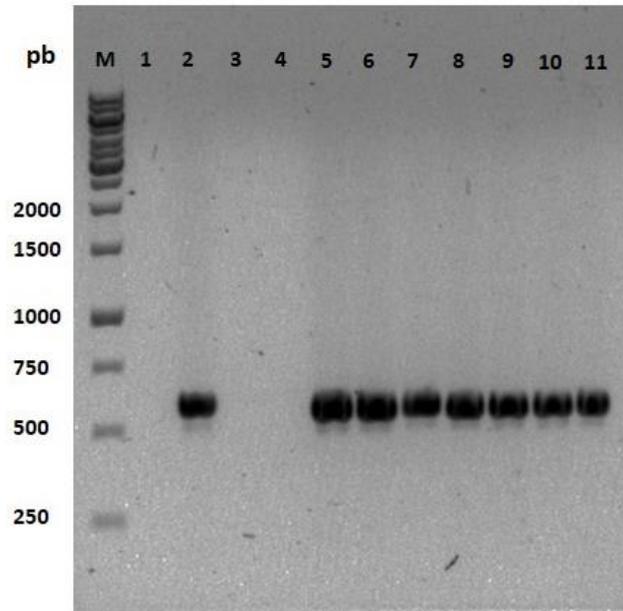


Figura 14. Gel de agarose com os produtos das PCRs dos DNAs genômicos utilizando os oligonucleotídeos específicos para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac 01 e Xac 02). 1) água ultrapura estéril, 2) DNA de *Xac306*, 3) DNA de *XauB*, 4) DNA de *XauC*, 5 a 7) DNA de três colônias de Δ XAC3898, 8 a 11) DNA de quatro colônias de Δ XAC2361. M: Marcador “GeneRuler™ 1kb DNA Ladder” (Fermentas). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 μ /mL).

4.3 Teste de patogenicidade em limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck)

O teste de patogenicidade dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em comparação com estirpe selvagem (*Xac306*) foi conduzido em plantas saudáveis de limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck), em laboratório de segurança que possui um sistema de filtragem absoluta do ar (filtros EPA) e pressão negativa, o que impede que os organismos fitopatogênicos escapem para o meio ambiente. Foram avaliadas as linhagens mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em comparação com a *Xac306* selvagem. Cada mutante e a estirpe selvagem foram cultivadas em meio NA a 29°C por 48 h. Após a incubação, três colônias de cada isolado foram transferidas para tubos contendo 10 mL de meio NB e incubados a 29°C por 16 h a 180 rpm. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 min a 4000 rpm, o meio de cultura foi descartado e os *pellets* bacterianos foram ressuspensos em água de torneira autoclavada, as suspensões foram ajustadas para a concentração de 10⁸ UFC/mL

($DO_{600\text{nm}}=0,3$) e, em seguida, foram diluídas de forma seriada para a concentração de 10^6 UFC/mL. Nove folhas jovens de três plantas foram inoculadas pela técnica de infiltração, com auxílio de uma seringa, em dois pontos na face abaxial das folhas; à esquerda da nervura central foi inoculada a estirpe selvagem, e à direita foi inoculado o mutante. Os mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$ foram inoculados em plantas diferentes. Para o controle negativo uma folha de cada planta foi inoculada com água de torneira estéril. As plantas inoculadas foram mantidas no laboratório de segurança sob condições de 29°C , fotoperíodo de 12 h e umidade em torno de 80%. A incidência da doença foi avaliada e registrada por meio de fotografia digital aos 1, 3, 5, 8, 10, 13, 15, 18, 21, 25 e 30 dias após a inoculação (DAI).

4.4 Curva de crescimento *in vitro*

A curva de crescimento *in vitro* foi feita em triplicata biológica para todos os isolados ($\Delta XAC2361$, $\Delta XAC3898$ e $Xac306$). As suspensões bacterianas foram ajustadas para $DO_{600\text{nm}} = 0,1$. Transferiu-se 1,5 mL de cada inóculo para poços de uma placa *multiwell*, em seguida foi incubada a 29°C sob agitação constante em leitor de microplacas Biotek Synergy H1. As leituras em $DO_{600\text{nm}}$ foram registradas a cada 30min por um período de 24 h, e as curvas foram analisadas no programa Prisma versão 6.0.

4.5 Curva de crescimento *in planta*

A curva de crescimento *in planta* foi realizada de acordo com Laia (2007), com modificações. Os mutantes $\Delta XAC2361$, $\Delta XAC3898$ e a $Xac306$ foram multiplicados em meio NA por 48 h a 29°C . Após a incubação, uma colônia de cada estirpe foi transferida para tubos contendo 10 mL de meio NB e incubados a 29°C por 16 h a 180 rpm. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 min a 4000 rpm, o meio foi descartado e os *pellets* bacterianos ressuspensos em solução PBS 1x, as suspensões bacterianas foram ajustadas para a concentração de 10^8 UFC/mL ($DO_{600\text{nm}}=0,3$) e em seguida as mesmas foram diluídas de forma seriada para a concentração de 10^6 UFC/mL. As suspensões bacterianas dos três isolados foram inoculadas em três plantas saudáveis de limão-cravo (*Citrus limonia* Osbeck), em laboratório de segurança. A inoculação foi realizada em dois a cinco pontos da face

abaxial das folhas, dependendo do tamanho da folha, por meio de perfuração, utilizando uma agulha de tuberculina. As análises quantitativas foram realizadas a 0, 1, 3, 6, 10 e 20 dias após a inoculação. A quantificação de número de células por área foi determinada retirando-se quatro discos de 1 cm² de cada isolado por planta. Os discos foliares foram macerados em 1 mL de PBS 1x, com auxílio de um pistilo. Em seguida, 10 µL/placa de cada suspensão e das suas diluições foram depositadas em placas de petri contendo meio de cultura NA, utilizando o método da gota. Após 48 h de incubação a 29°C foi contado o número de colônias formadas em cada gota.

4.6 Ensaio de autoagregação

O ensaio de autoagregação foi realizado em triplicata para os mutantes $\Delta XAC2361$, $\Delta XAC3898$ e para a *Xac306*. As bactérias foram cultivadas em erlenmeyers de 125 mL, contendo 20 mL de meio NB, por 16 h a 29°C, 180 rpm. As suspensões bacterianas foram ajustadas para $DO_{600nm} = 2,5$, e 10 mL de cada cultura foram transferidos para tubos de ensaio tipo borosilicato estéreis de 20 mL. Os tubos foram agitados vigorosamente em vortex por 15 seg e foi realizada a primeira leitura (tempo 0), onde uma alíquota de 100 µL retirada do topo de cada tubo (altura de 1 cm) foi transferida para microtubos contendo 900 µL de meio de cultura NB (diluição 10X). As leituras foram realizadas em biofotômetro (Eppendorf) na DO_{600nm} a cada hora, durante um período de 12 h, e uma leitura final após 24 h do início destas. Os tubos permaneceram estáticos durante esse período. As leituras de cada microtubo foram realizadas em triplicata e o valor médio obtido multiplicado por 10. As médias de cada tempo foram divididas pela média do tempo 0.

4.7 Ensaio de formação de biofilme

A produção de biofilme pela linhagem *Xac306* e pelos mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$ foi avaliada de acordo com Yan, Hu e Wang (2012), com algumas modificações. Para a avaliação da formação de biofilme, quatro colônias isoladas de cada linhagem foram repicadas em placas de Petri contendo meio NA e incubadas a 29°C por 48 h. As massas bacterianas foram ressuspensas em meio de cultura líquido NB e as suspensões ajustadas para $DO_{600nm} = 0,3$, em seguida 1 mL de cada suspensão foi transferido para tubos de ensaio tipo borosilicato estéreis, que foram

incubados a 29°C por 72 h sem agitação. O biofilme formado foi visualizado por meio de coloração com solução de cristal violeta 0,1% e lavado duas vezes com água ultrapura estéril. O biofilme foi dissolvido em 1 mL de solução de etanol e acetona (80:20) e quantificado por meio de espectrofotometria (DO_{590nm}).

4.8 Extração e quantificação de goma xanthana

A goma de três réplicas biológicas de cada isolado ($\Delta XAC2361$, $\Delta XAC3898$ e $Xac306$) foi extraída de acordo com Lo et al. (1997) com modificações. Os pré-inóculos foram ajustados para $DO_{600nm} = 0,3$ e, em seguida, 2,5 mL de cada inóculo foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio goma xanthana e incubado a 29°C, a 180 rpm, durante 96 h. Após, os 100 mL de cultura foram centrifugados a 10.000g a 4°C por 40 min. Os *pellets* bacterianos foram ressuspensos em 1 mL de água ultrapura autoclavada e transferidos para béquers de vidro de 50 mL (com peso conhecido) e mantidos a 70°C por 24 h, em seguida foram pesados. Os sobrenadantes foram transferidos para béquers de plástico de 500 mL, adicionado 4 g de KCl e agitados durante 15 min, em seguida foi adicionado 200 mL de isopropanol gelado para precipitar a goma. Com o auxílio de um bastão de vidro limpo, fazendo movimentos circulares, a goma foi separada da parte líquida, sendo então transferida para copos descartáveis (com pesos conhecidos) e mantidos a 37°C por 72 h e em seguida pesados. O peso da goma dividido pelo peso da massa de bactérias correspondente fornece a quantidade de goma produzida pela biomassa de bactéria presente no meio de cultura.

4.9 Avaliação da motilidade

As motilidades do tipo *swimming* e *swarming* foram avaliadas conforme descrito por Li e Wang (2011b). A DO_{600nm} dos pré-inóculos foi ajustada para 0,3. O experimento foi realizado com 3 réplicas biológicas e 4 réplicas técnicas de cada linhagem. As fotografias das placas foram registradas no transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (BIORAD®) e os diâmetros das colônias foram medidos utilizando o programa ImageJ.

4.10 Sobrevivência em SDS

A sobrevivência em meio de cultura contendo o detergente SDS (Dodecil sulfato de sódio) foi avaliada de acordo com o descrito por Ficarra et al. (2017), no entanto, a concentração final de SDS utilizada foi de 0,003%.

4.11 Análise da ORF XAC2361 por microscopia de fluorescência

4.11.1 Obtenção da ORF XAC2361 com o peptídeo sinal

As reações de PCR para a obtenção da ORF XAC2361 com o peptídeo sinal foram realizadas no volume final de 20µL. Cada reação continha 100 ng de DNA cosmidial, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs), 1X do tampão da enzima, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 4), 3% de DMSO (Dimetilsulfóxido) e água ultrapura estéril. A PCR foi realizada utilizando o termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (AB Applied Biosystems). Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 98°C por 1 min, seguida de 25 ciclos de 98°C por 10 seg, 68°C por 15 seg e 72°C por 30 seg, e uma extensão final a 72°C por 10 min. A amplificação do fragmento esperado foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo 10 µg/mL de brometo de etídeo, com o tampão de corrida TBE (Tris-Borate-EDTA: 54 g Tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0 para 1 L) a 0,5X e 3 V/cm. Os fragmentos amplificados foram visualizados e documentados por fotografia no transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (BIORAD®). O DNA da ORF foi purificado a partir dos produtos de PCR utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificados no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos para obtenção da ORF XAC2361, ambos possuem o sítio da enzima de restrição *Xho*I.

Nome do Oligonucleotídeo	Sequencia 5' => 3'
XAC2361GFPNT-F	GACTCGAGATGCGCGCAGTCCTGTTTG
XAC2361GFPNT-R	CAGAGCTCCTTCGTCCGCTCAAGCACC

*Oligonucleotídeos sintetizados pela IDT (Integrate DNA Technologies)

4.11.2 Digestão da ORF2361 e do vetor pMAJ1

A ORF XAC2361 e o vetor pMAJ1 (PENA, M. M., não publicado) foram submetidos a digestão enzimática utilizando *Xho*I (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A confirmação da digestão do vetor foi feita através da visualização em gel de agarose 1%. Os produtos das digestões foram purificados por meio do kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

4.11.3 Clonagem no vetor pMAJ1 e transformação em *E. coli* DH10B quimicamente competentes

A ORF XAC2361 contendo os sítios da endonuclease *Xho*I foi ligada no vetor pMAJ1 digerido com a mesma enzima, na posição C-terminal da proteína mCherry. A ligação foi feita utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas), seguindo as recomendações do fabricante. O produto da ligação foi utilizado para transformar células de *E. coli* DH10B quimicamente competentes de acordo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) com modificações. As células transformadas foram cultivadas em meio LB sólido, contendo carbenicilina (100 µg/mL), e mantidas por 16 horas a 37°C. A confirmação da clonagem foi feita através da extração plasmidial de algumas colônias obtidas na transformação, reações de PCR utilizando GoTaq® DNA Polymerase (descrito anteriormente) e visualização em gel de agarose 1%.

4.11.4 Transformação em células eletrocompetentes de *Xac306*

Células eletrocompetentes de *Xac306* foram transformadas com as construções pMAJ1 + inserto da ORF XAC2361 de acordo com o protocolo estabelecido por do Amaral et al. (2005), com modificações. Após a transformação, 200 µL da suspensão de células foram plaqueadas em meio NA contendo 20 µg/mL de canamicina, e incubadas a 29°C por 72 h.

4.11.5 Seleção dos transformantes

Para a seleção dos transformantes as colônias obtidas após a transformação em *Xac306* foram transferidas, com o auxílio de palitos estéreis, para meio NA

contendo 0,2% de amido. As placas foram incubadas a 29°C por 24 h e em seguida coradas com iodo metálico para observar a degradação do amido.

4.11.6 Microscopia de fluorescência

A Análise por microscopia foi realizada seguindo as instruções para o microscópio de fluorescência Olympus BX61, tendo como fonte de luz a lâmpada de fluorescência X-Cite® SERIES 120 Q, as imagens foram registradas pela câmera de microscópio Orca Flash 2.8 (Hamamatsu), utilizando o filtro TexasRed.

Para isso, inicialmente foram coletadas amostras em diferentes tempos de indução. Após o crescimento *overnight* (16 h) das colônias de *Xac306* selvagem, *Xac306* contendo o vetor pMAJ1, *Xac306* contendo a construção pMAJ1+XAC2361 integrada na região da ORF, *Xac306* contendo a construção pMAJ1+XAC2361 integrada no sítio *Amy* as amostras foram ajustadas para a $DO_{600nm} = 0,1$ e então foram coletadas alíquotas de 10 μ L após 2 h, 4 h, 6 h que foram pingadas em lâminas contendo uma fina camada de gel de agarose. A amostra contendo pMAJ1+XAC2361 integrada no sítio *Amy* foi dividida em induzida com arabinose 0,05% e não induzida.

4.12 Detecção da proteína de fusão XAC2361-mCherry por Western blot

Para esta análise, inicialmente foram coletadas amostras em diferentes tempos de indução. Após o crescimento *overnight* (16 h) das colônias de *Xac306* selvagem, *Xac306* contendo o vetor pMAJ1, *Xac306* contendo a construção pMAJ1+XAC2361 integrada na região da ORF, *Xac306* contendo a construção pMAJ1+XAC2361 integrada no sítio *Amy* e *E. coli* contendo o vetor pMAJ1, as amostras foram ajustadas para a $DO_{600nm} = 0,1$. Em seguida, foram coletadas alíquotas de 1 mL após 2 h, 4 h, 6 h e 8 h para *Xac* e 1 h e 2 h para *E. coli*, sendo que apenas a amostra contendo pMAJ1+XAC2361 integrada no sítio *Amy*, a *Xac306* e a *E. coli* contendo o vetor pMAJ1 foram induzidas com arabinose 0,05%.

Após cada coleta, as amostras foram centrifugadas 12000 x g por 2 min e os sobrenadantes descartados, em seguida, as amostras de *Xac* foram lavadas uma vez com água ultrapura estéril para remoção do excesso de goma, descartando o sobrenadante novamente e os *pellets* foram armazenados a -20°C. As proteínas totais foram extraídas, adicionando-se 150 μ L tampão de lise sem glicerol por amostra (1

mL de TrisHCl pH6,8, 1,6 mL de SDS 10% e água q.s.p. 8 mL) e em seguida homogeneizando e fervendo-as por 5 min, para serem então centrifugadas por 10 min a 12000 x g e os sobrenadantes transferidos para novos tubos, os *pellets* foram descartados.

As amostras foram quantificadas por meio do DC Protein Assay kit (Bio-Rad) e as amostras padronizadas para a concentração de 0,6 mg de proteínas por mL, e em então foi misturado 3 partes de cada amostra padronizada para 1 parte de tampão completo (1 mL de TrisHCl pH6,8 0,5M, 1,6 mL de glicerol 80%, 1,6 mL de SDS10%, 0,4 mL de β -mercaptoetanol, 0,4 mL de azul de bromofenol 0,5% e água q.s.p. 8 mL). Foram aplicados cerca de 6 μ g de proteínas de cada amostra em dois géis de poliacrilamida 12%, que foram submetidos à eletroforese SDS-PAGE por 2 h e 30 min a 100 V. Em seguida, um dos géis foi submetido à eletroforese de transferência por 1 h a 60 V, para ligar as proteínas a uma membrana de nitrocelulose Hybond (Amersham Biosciences), que foi tratada para a técnica de Western blot seguindo as instruções do kit Westar Nova 2011 (Cyanagen) e do manual antibodies Protocol Guide (Clontech): a) A membrana foi bloqueada *overnight* a 4°C em tampão contendo proteínas do leite; b) incubada por 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo primário mCherry Polyclonal Antibody (Invitrogen) com afinidade pela proteína mCherry diluído na proporção 1:2500; c) incubada 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário Anti Rabbit – Gt x Rb 1gG (H+L) HRP Ap 307p (Millipore) diluído na proporção 1:10000 com afinidade pelo anticorpo primário; d) tratada por 1 min com substrato quimioluminescente contendo luminol + peróxido (Cyanagen) com afinidade pelo anticorpo secundário e e) a quimioluminescência do anticorpo secundário foi detectada por meio da revelação de filme para raio x Hyperfilm ECL (Amersham), com o uso de soluções reveladora e fixadora (Sigma-Aldrich P7042 e P7167), seguindo as recomendações do fabricante.

4.13 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP. Após o crescimento em meio de cultura NA por 72 h a 29°C, pedaços de gel contendo massa bacteriana transferidos para microtubos de 2 mL, onde foi realizada a fixação em glutaraldeído a 3%, em tampão de fosfato de potássio a 0,05 M e pH 7,2 a 7,4, os

tubos foram mantidos em geladeira (5 – 8°C) por 72 h. Após a fixação, a solução de glutaraldeído foi removida, e as culturas foram cuidadosamente lavadas com a solução tampão pura. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 2%, nas mesmas condições por 12 h. Então, foram novamente lavadas, desidratadas em uma série gradual de acetona, secas em secador de ponto crítico, montadas em porta-espécimes, recobertas com uma camada de 36 nm de ouro paládio e elétrônmicrografadas em utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss Evo MA10, operando em 15 kV. As medidas do comprimento e largura de 30 células de cada amostra foram tomadas utilizando o programa ImageJ.

4.14 Análise estatística

Os resultados dos experimentos de produção de biofilme, extração de goma xanthana e motilidade foram analisados pelo Assistat Software Versão 7.7, empregando teste Tukey a 5% ou 1% de probabilidade. Para a análise de variância da microscopia eletrônica de varredura foi utilizado o programa SigmaPlot 14.0.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de patogenicidade em limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck)

O teste de patogenicidade, aparentemente, não demonstrou diferenças na patogenicidade e virulência do mutante $\Delta XAC2361$ em relação a *Xac306* selvagem (Figura 15). No entanto, o mutante $\Delta XAC3898$ apresentou uma redução bastante significativa dos sintomas em comparação com a estirpe selvagem, o que demonstra uma perda da virulência deste mutante (Figuras 16).

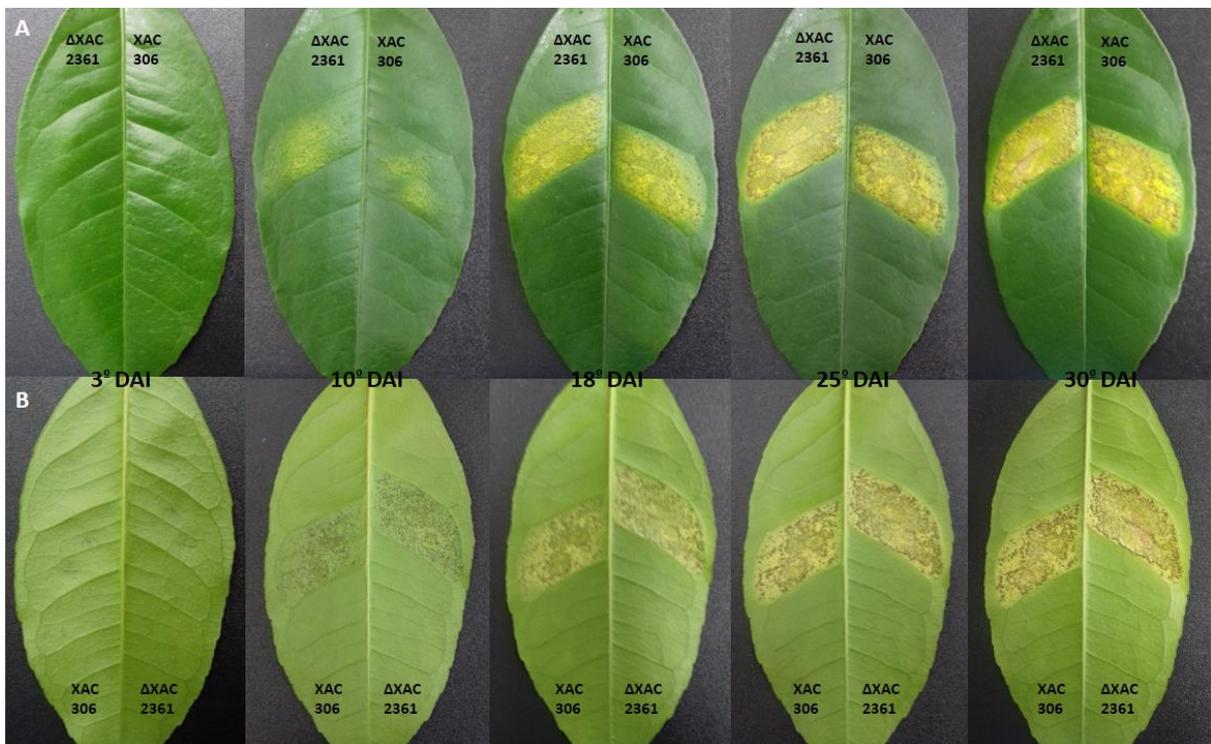


Figura 15. Foto do teste de patogenicidade em limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). Suspensões bacterianas contendo 10^6 UFC/mL inoculadas na face abaxial das folhas. À direita da nervura principal, o mutante $\Delta XAC2361$, e à esquerda a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (3, 10, 18, 25 e 30 dias após a inoculação). A: Superfície adaxial da folha. B: Superfície abaxial da folha.

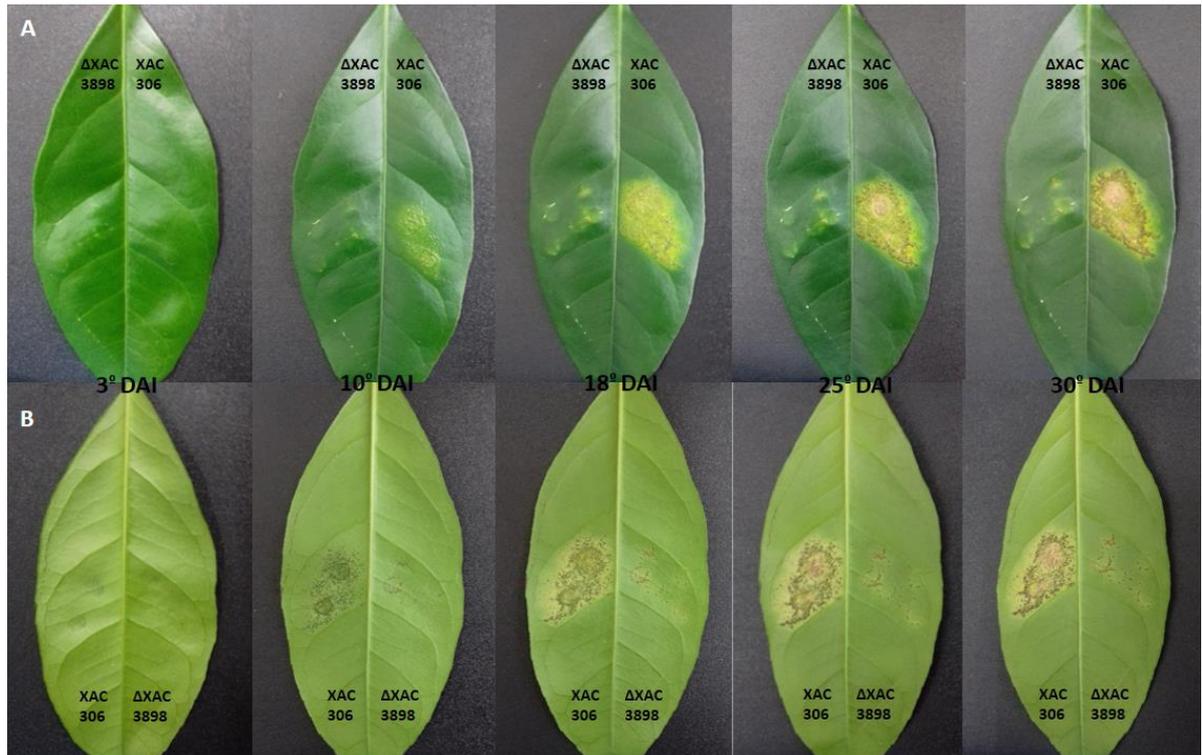


Figura 16. Foto do teste de patogenicidade em limão cravo (*Citrus limonia* Osbeck). Suspensões bacterianas contendo 10^6 UFC/mL inoculadas na face abaxial das folhas. À direita da nervura principal, o mutante Δ XAC3898, e à esquerda a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 (3, 10, 18, 25 e 30 dias após a inoculação). A: Superfície adaxial da folha. B: Superfície abaxial da folha.

5.2 Curva *in vitro*

As três linhagens (*Xac306* selvagem e mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898) apresentaram uma fase *lag* semelhante. Na curva do mutante Δ XAC2361 é possível observar uma fase log mais curta em relação a estirpe selvagem, entrando mais rapidamente nas fases estacionária e de declínio. Enquanto que o mutante Δ XAC3898 levou mais tempo para entrar na fase estacionária em relação a estirpe selvagem (Figura 17). Portanto, é possível observar uma diferença significativa no crescimento *in vitro* dos mutantes em relação a estirpe selvagem.

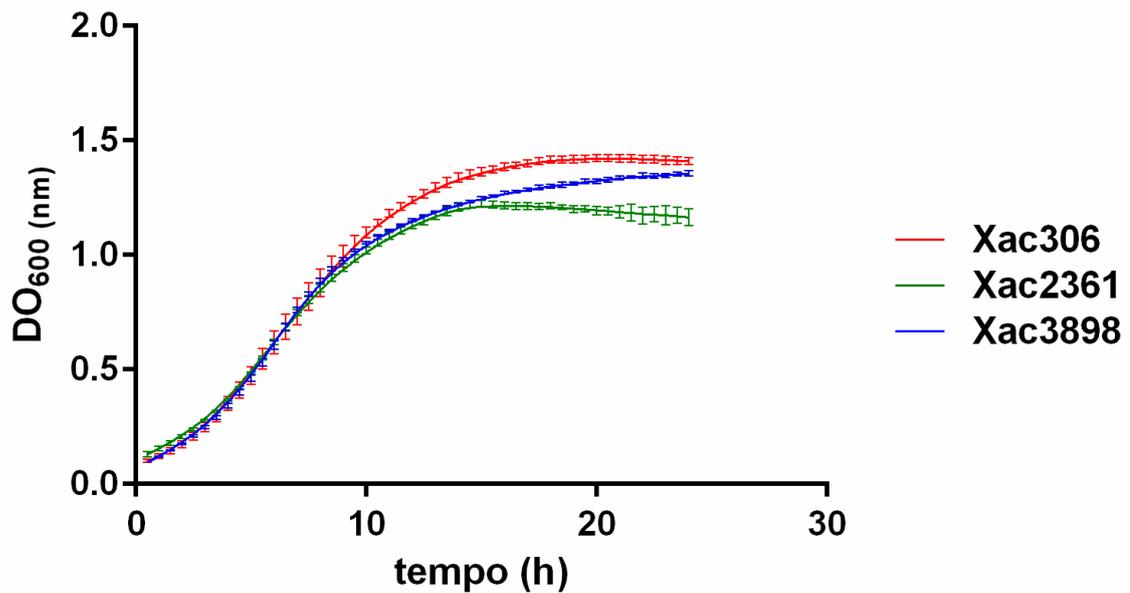


Figura 17. Curva *in vitro* comparando o crescimento em meio de cultura NB dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em relação a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, no período de 24 h. Leituras da DO_{600nm} a cada hora, com os respectivos desvios padrões. A curva foi construída com o programa Prisma versão 6.0.

5.3 Curva de crescimento *in planta*

Corroborando com o que foi observado no teste da patogenicidade, o mutante Δ XAC2361 apresentou comportamento de crescimento *in planta* semelhante ao da *Xac306* selvagem. Enquanto que o mutante Δ XAC3898 demonstrou menor capacidade de crescimento *in planta*, sendo este, reduzido em quase 100x em relação a *Xac306* selvagem, provavelmente devido a que, de alguma maneira, este gene está envolvido com a habilidade da bactéria em crescer na planta e na sua virulência (Figura 18).

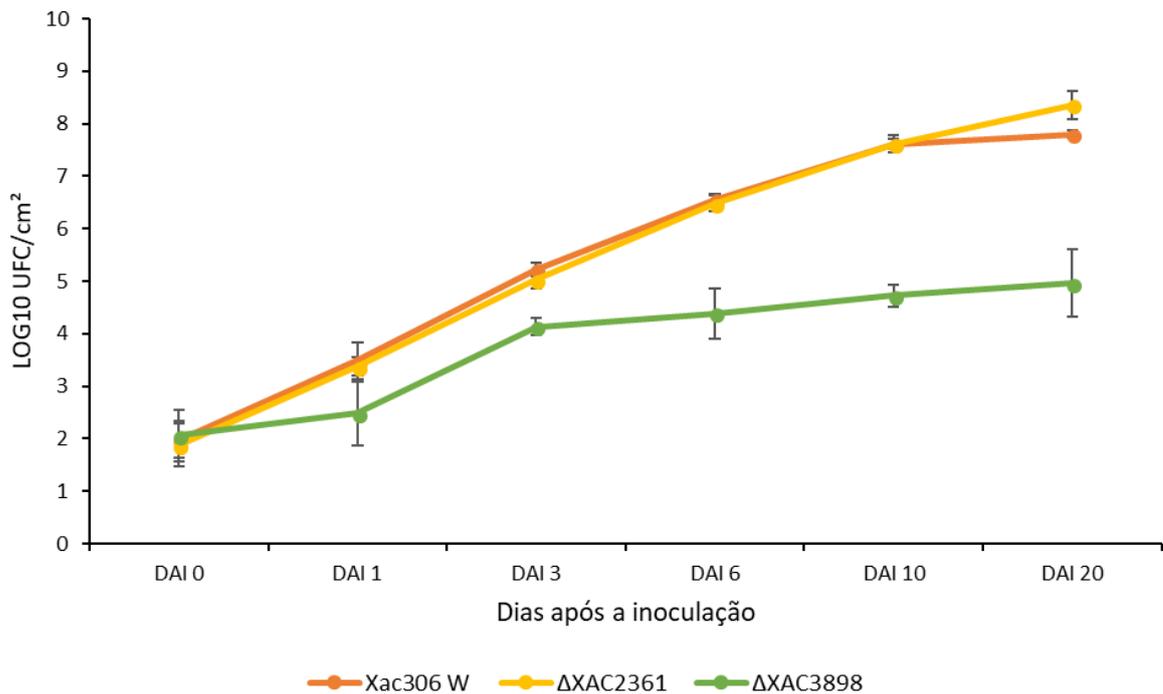


Figura 18. Curva de crescimento *in planta* dos mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$ em relação a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, entre os dias 0 e 20 após a inoculação. O inóculo inicial continha 10^6 UFC/mL.

5.4 Ensaio de autoagregação

O ensaio de autoagregação mostrou que o mutante $\Delta XAC2361$ possui comportamento semelhante ao da estirpe selvagem, enquanto o mutante $\Delta XAC3898$ apresentou comportamento diferente da selvagem. O mutante $\Delta XAC3898$ apresentou dificuldade em agregar as células em suspensão durante todo o período de ensaio (Figuras 19 e 20).

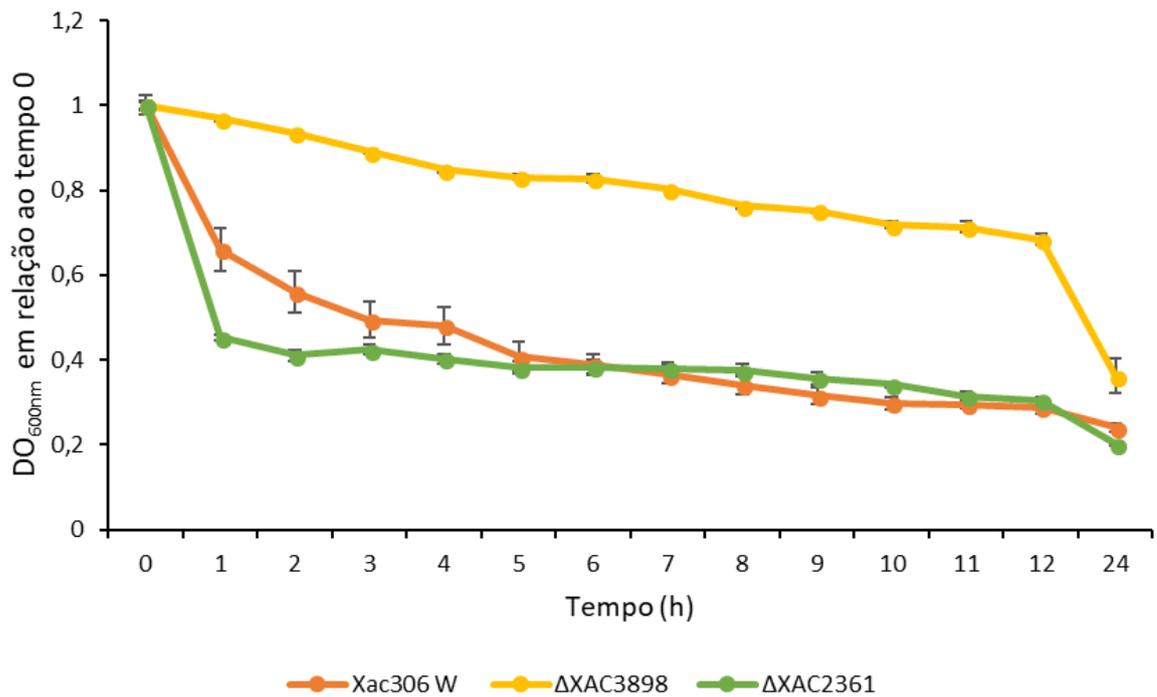


Figura 19. Autoagregação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898, durante o período de 24 h (leituras a cada hora durante 12 h e leitura final após 24 h, sem agitação).

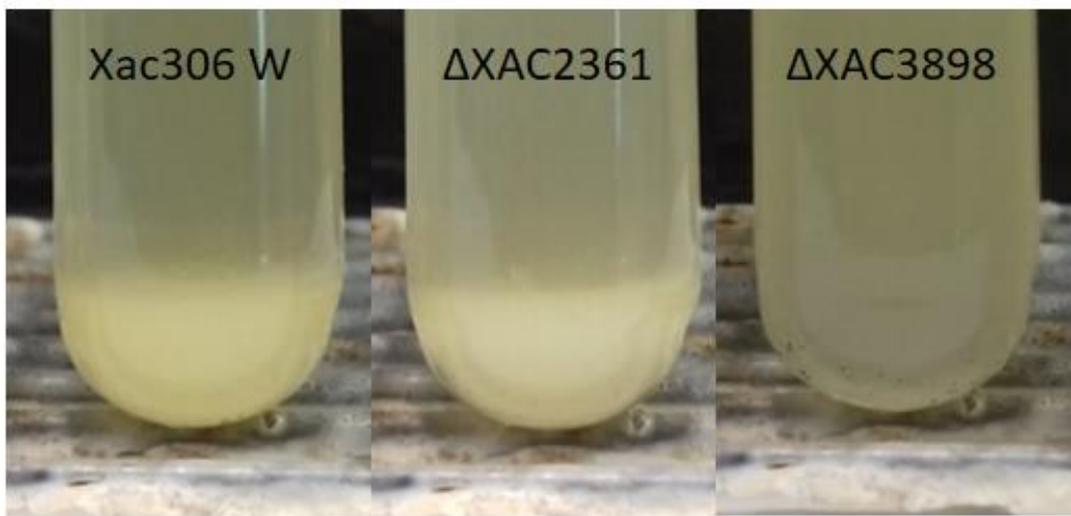


Figura 20. Fotografia ilustrando o ensaio de autoagregação dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em comparação com a estirpe selvagem *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 após 12 horas sem agitação.

5.5 Ensaio de formação de biofilme

A formação de biofilme do mutante $\Delta XAC2361$ foi semelhante ao formado pela estirpe selvagem de *Xac306*, enquanto que o biofilme formado pelo mutante $\Delta XAC3898$ foi cerca de 2,3 vezes maior do que o biofilme formado pela *Xac306* selvagem (Figuras 21 e 22). O coeficiente de variação foi de 17,94%.

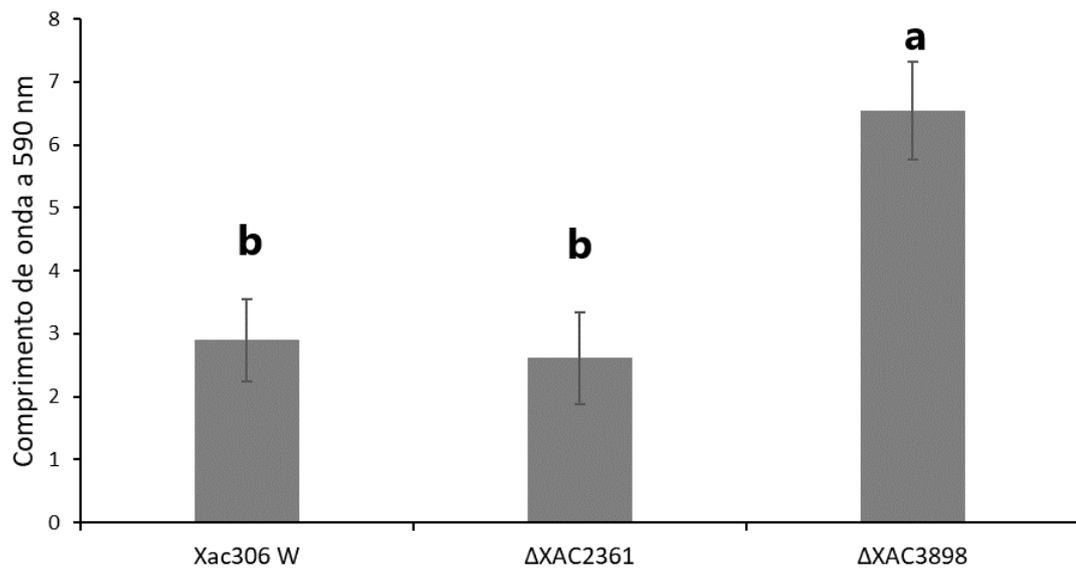


Figura 21. Formação de biofilme pela estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e pelos mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

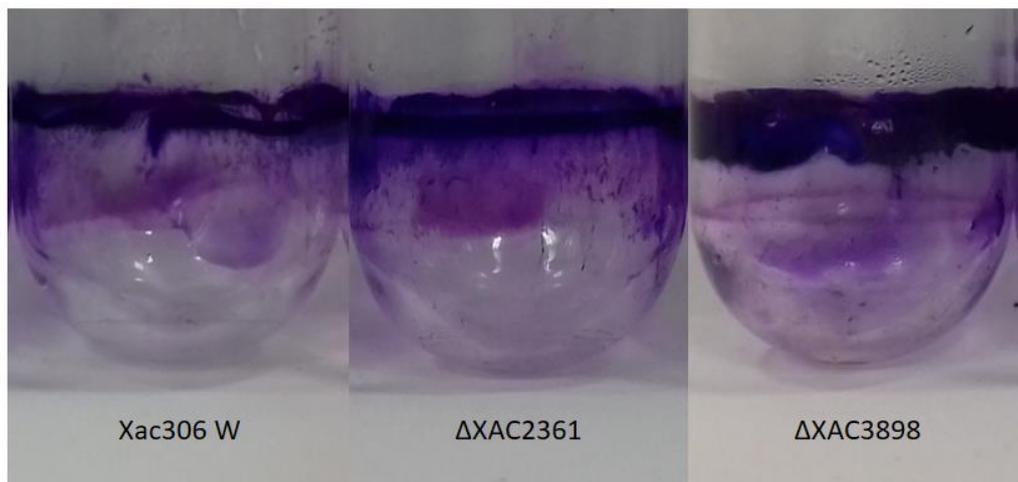


Figura 22. Fotografia ilustrando a formação de biofilme pela estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e pelos mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$ em tubos de ensaio tipo borossilicato.

5.6 Extração e quantificação de goma xanthana

No mutante $\Delta XAC3898$ foi observado uma formação de goma xanthana cerca de 3,5 vezes maior em comparação a *Xac306* selvagem e ao mutante $\Delta XAC2361$, enquanto que a estirpe selvagem e o mutante $\Delta XAC2361$ não apresentaram diferenças significativas entre si (Figura 23). A análise estatística apresentou um coeficiente de variação de 31,41%.

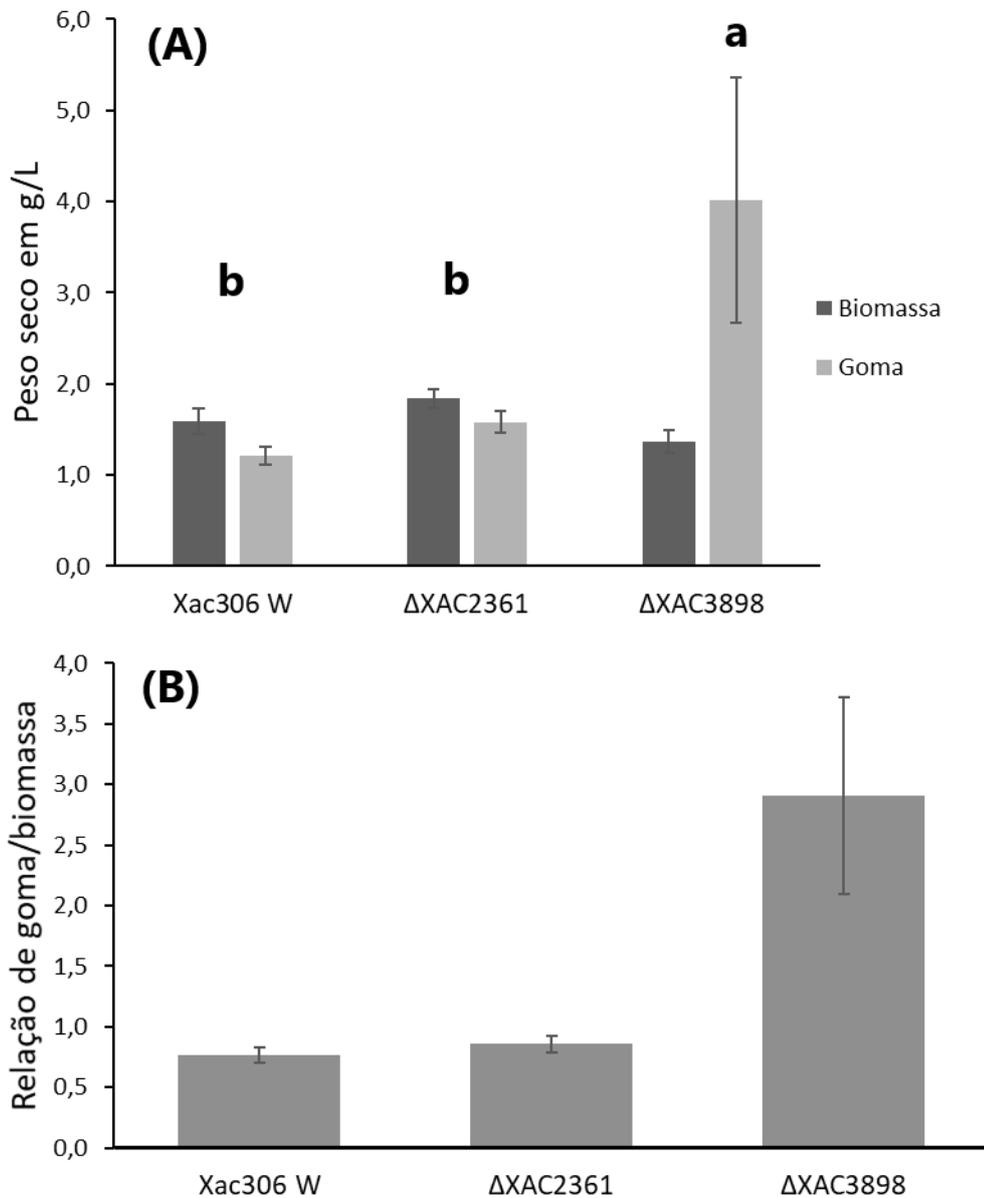


Figura 23. A) Quantidade de biomassa e goma xanthana produzida por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e pelos mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$. B) Relação de goma/biomassa em cada linhagem bacteriana. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5.7 Avaliação da motilidade

Os testes de motilidade *swimming* e *swarming* não mostraram diferenças significativas entre a estirpe selvagem e o mutante $\Delta XAC3898$. No entanto, ambos diferiram do mutante $\Delta XAC2361$ (Figuras 24 e 25), o qual apresentou menor motilidade e esta diferença foi significativa ao nível de 5% de probabilidade. O diâmetro médio das colônias de $\Delta XAC2361$ foi aproximadamente 1,7 vezes menor em comparação ao diâmetro médio de *Xac306* selvagem para o tipo *swimming* e quase 1,2 vezes menor para o tipo *swarming*. De acordo com a análise estatística a motilidade do tipo *swimming* teve um coeficiente de variação de 9,34%, enquanto que a do tipo *swarming* foi de 6,47%.

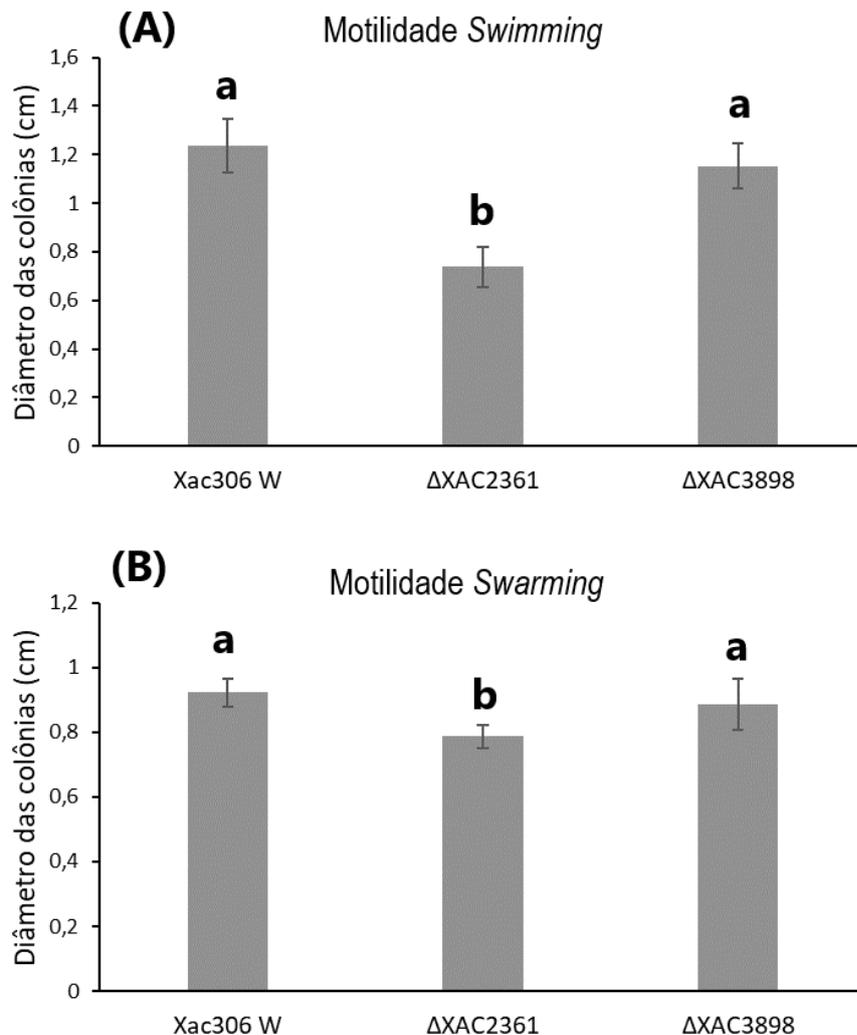


Figura 24. A) Motilidade *swimming*; B) Motilidade *swarming* da estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e dos mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

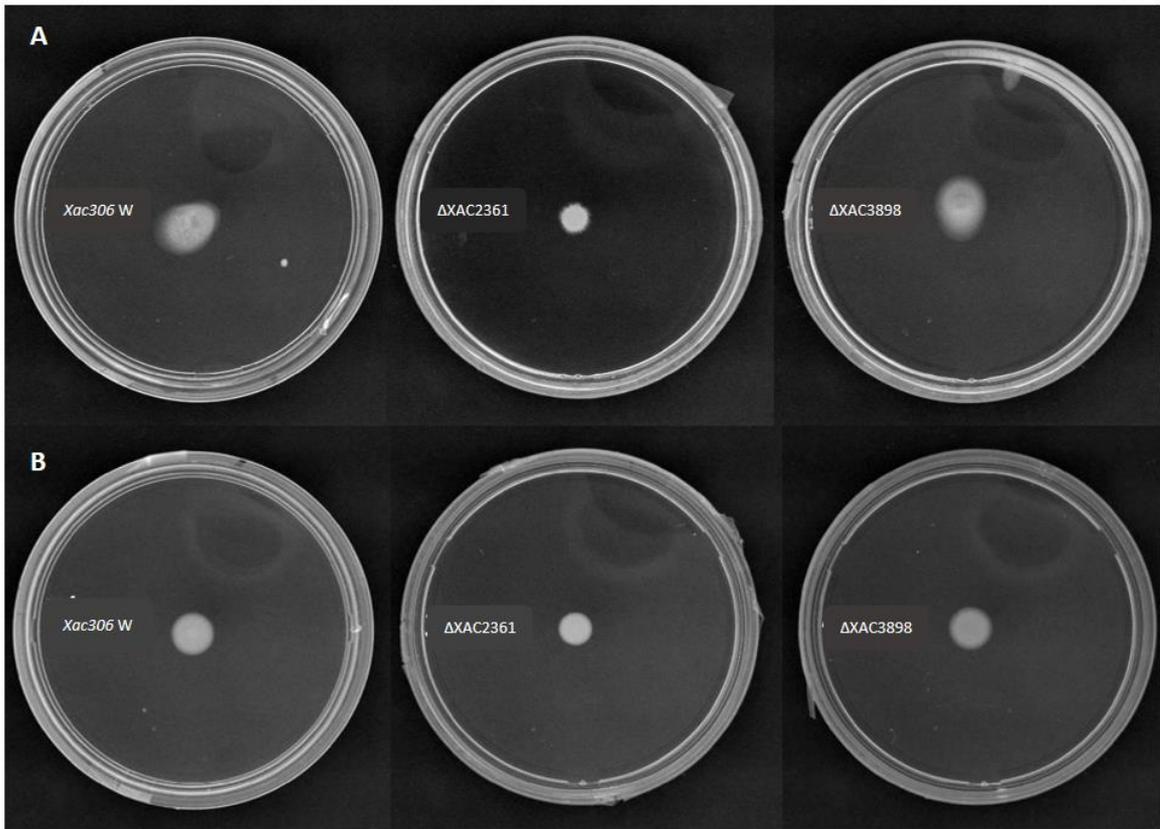


Figura 25. A) Fotografia ilustrando a motilidade tipo *swimming* da estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e dos mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$, da esquerda para a direita. B) Fotografia ilustrando a motilidade tipo *swarming* da estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e dos mutantes $\Delta XAC2361$ e $\Delta XAC3898$, da esquerda para a direita.

5.8 Sobrevivência em SDS

A análise de sobrevivência em SDS demonstrou que o mutante $\Delta XAC2361$ apresentou uma capacidade de sobrevivência 50% menor em relação à estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 e ao mutante $\Delta XAC3898$, os quais tiveram capacidade de sobrevivência semelhantes (Figura 26).

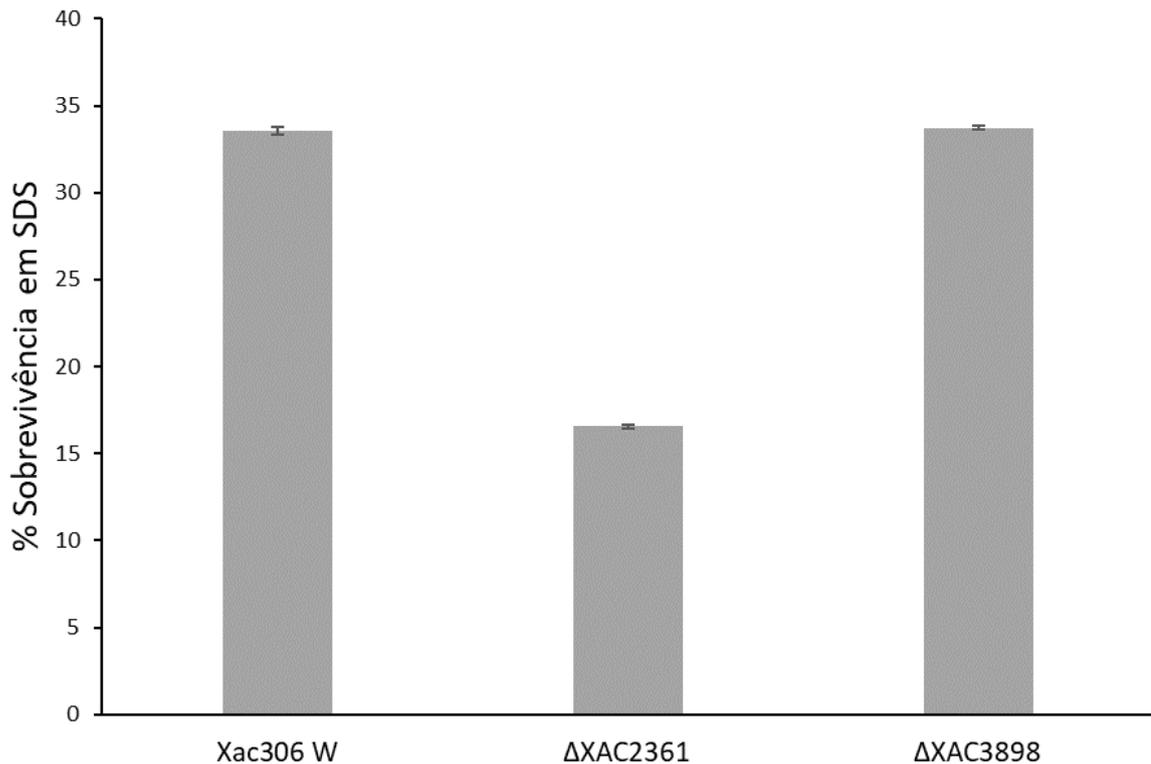


Figura 26. Sobrevivência dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898 em comparação a estirpe selvagem de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306, após serem submetidos a SDS (Dodecil sulfato de sódio) na concentração final de 0,003%.

5.9 Análise da proteína de fusão XAC2361-mCherry por microscopia de fluorescência

Após a transformação da construção XAC2361-mCherry em *Xac306* foi realizado o teste do amido (Figura 27), onde foi possível observar as colônias onde o plasmídeo contendo a sequência da proteína de fusão XAC2361-mCherry se integrou no sítio *Amy* ou na região da ORF XAC2361. Quando o plasmídeo se integra no sítio *Amy*, a bactéria deixa de degradar amido e quando o meio é corado com iodo metálico é possível observar a não formação do halo ao redor da colônia. Por outro lado, quando o plasmídeo se integra na região da ORF, continua havendo a degradação do amido, portanto o halo ao redor da colônia é observado. Nas colônias que possuem o plasmídeo integrado em *Amy* a expressão da proteína de fusão é controlada pelo promotor do plasmídeo, o que permite que expressão desta seja induzida ou não induzida, neste caso a indução é feita por arabinose. Enquanto que, nas colônias em

que o plasmídeo é integrado na região da ORF a expressão da proteína é controlada pelo promotor nativo, o que não permite a indução.



Figura 27. Fotografia ilustrando o teste de degradação do amido em meio NA contendo 0,2% de amido e corado com iodo metálico, onde observa-se a formação de halo ao redor da colônia de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem (ao centro) e também das colônias onde o plasmídeo se integrou na região da ORF. Nas colônias onde não há a formação de halo, a integração do plasmídeo ocorreu no sítio *Amy*.

A análise por microscopia de fluorescência, com o intuito de verificar a localização da proteína de fusão XAC2361-mCherry, mostrou predominantemente uma fluorescência dispersa, porém como nuvem fraca por toda a célula (Figura 28).

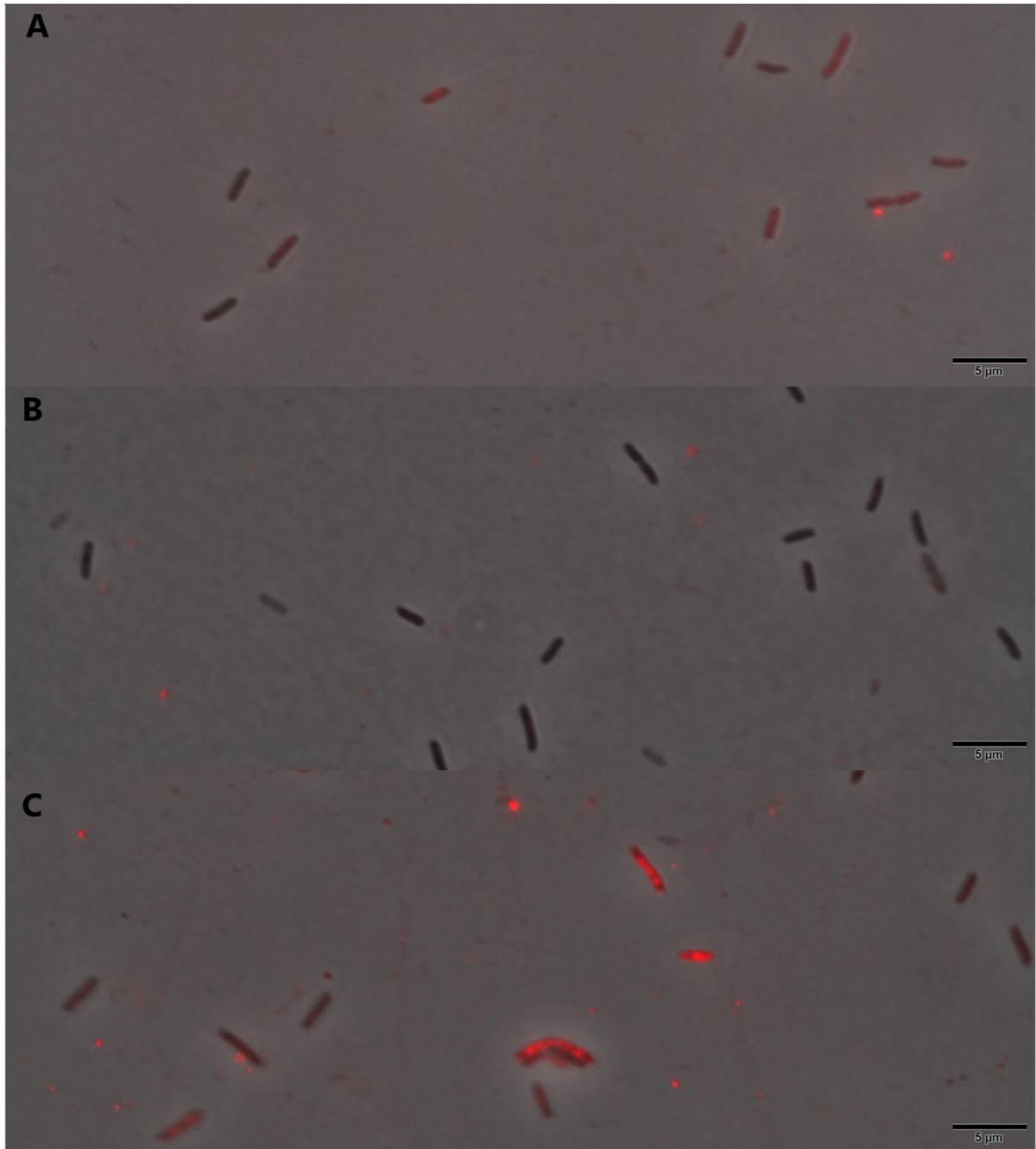


Figura 28. Fotografia ilustrando a microscopia de fluorescência da proteína de fusão XAC2361-mCherry, em células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, utilizando microscópio de fluorescência Olympus BX61, fonte de luz a lâmpada de fluorescência X-Cite® SERIES 120 Q e as imagens registradas pela câmera de microscópio Orca Flash 2.8 (Hamamatsu). A) Proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada em *Amy* após 2h de indução com 0,05% de arabinose. B) Proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada em *Amy* não induzida. C) Proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada na região da ORF XAC2361 após 4h de indução com 0,05% de arabinose.

5.10 Detecção da proteína de fusão XAC2361-mCherry por Western blot

Não foi possível detectar a proteína de fusão XAC2361-mCherry por meio de Western blot. Apenas a proteína mCherry dos controles positivos de *E. coli* e *X. citri* subsp. *citri* contendo o vetor pMAJ1 foi detectada (Figura 29). De acordo com o banco de dados UniProt a proteína mCherry possui 26,7 kDa de massa, que corresponde ao tamanho das bandas visualizadas no filme após a revelação. A proteína expressada pela ORF XAC2361 possui massa de 29,5 kDa (UniProt, 2017). Assim, estima-se que a proteína de fusão XAC2361-mCherry deve possuir uma massa de aproximadamente 56,2 kDa.

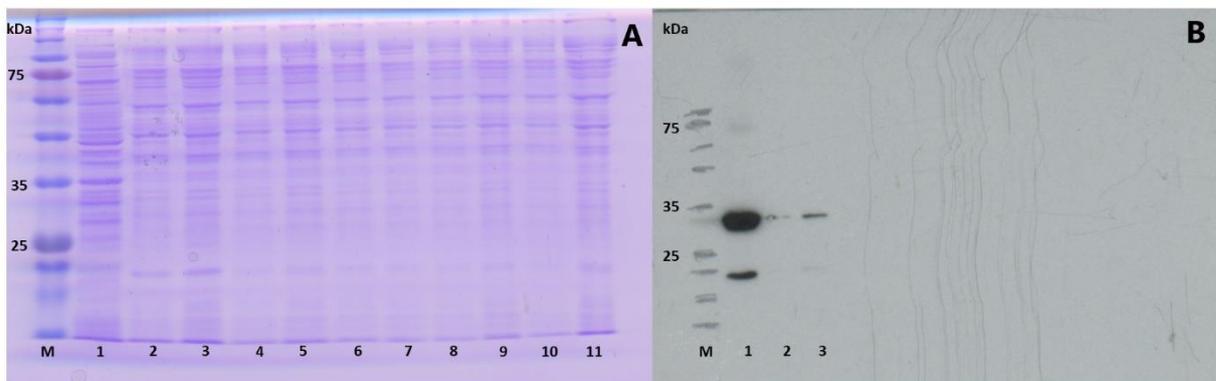


Figura 29. A) Gel SDS-PAGE demonstrando as proteínas totais extraídas das amostras coletadas após 2 e 4 s de crescimento partindo da $DO_{600nm} = 0,1$. M) True Color High Range Protein Marker (Sinapse ino). 1) Controle positivo (pMAJ1 em *E. coli* após 1 h de indução com 0,05% de arabinose). 2 e 3) Controle positivo (pMAJ1 em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 após 2 e 4 h de indução com 0,05% de arabinose). 4 e 5) *X. citri* subsp. *citri* 306 após 2 e 4 h de crescimento. 6 e 7) *X. citri* subsp. *citri* 306 contendo a proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada na região da ORF XAC2361 após 2 e 4 h de crescimento. 8 e 9) *X. citri* subsp. *citri* 306 contendo a proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada no sítio *Amy* após 2 e 4 h de crescimento. 10 e 11) *X. citri* subsp. *citri* 306 contendo a proteína de fusão XAC2361-mCherry integrada no sítio *Amy* após 2 e 4 h de crescimento com indução a 0,05% de arabinose. B) Filme de raio-x mostrando detecção da proteína mCherry, por meio de western blot, utilizando anticorpo primário mCherry Polyclonal Antibody (Invitrogen) e o anticorpo secundário Anti Rabbit – Gt x Rb 1gG (H+L) HRP Ap 307p (Millipore), seguindo a ordem das amostras descritas no item A.

5.11 Microscopia eletrônica de varredura

Por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar que o mutante $\Delta XAC3898$ apresentou uma maior relação entre a largura e comprimento de suas células em comparação a *Xac306* selvagem e ao mutante

Δ XAC2361, que diferiram entre si. Houve, portanto, uma significativa redução no comprimento das células (Figuras 30 e 31). Não foi possível observar os flagelos, devido ao método de preparação das amostras, já que as células de *Xac* apresenta um único flagelo que é ligado fracamente ao pólo.

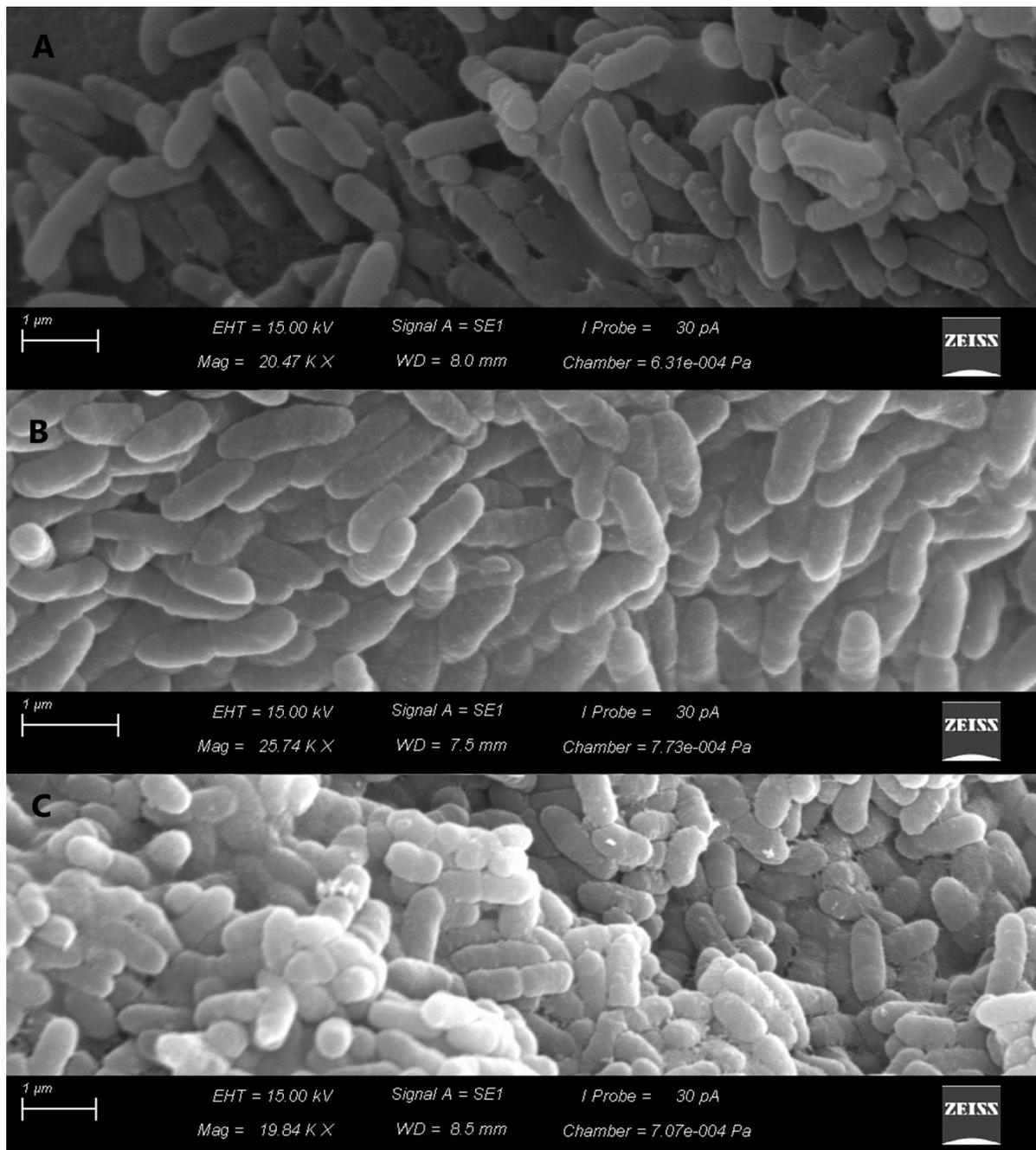


Figura 30. Fotografia ilustrando a microscopia eletrônica de varredura de células de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem (A), do mutante Δ XAC2361 (B) e do mutante Δ XAC3898 (C), utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss Evo MA10, operando em 15 kV.

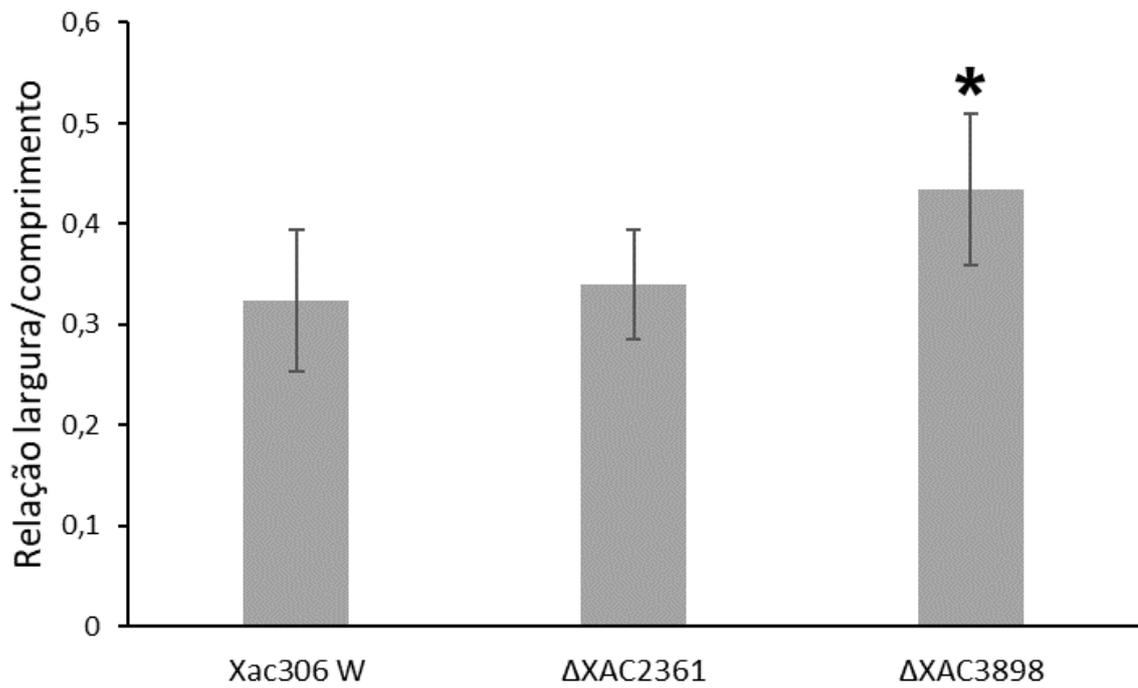


Figura 31. Relação entre a largura e comprimento das células *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 selvagem e dos mutantes Δ XAC2361 e Δ XAC3898, por análise das imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura. O asterisco representa uma significância estatística de $p < 0,05$ segundo o teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Os membros da família M23 são tipicamente metaloendopeptidases dependentes de zinco, que clivam as ligações peptídicas nos peptidoglicanos (PG) nas paredes celulares e têm como alvo específico as ligações peptídicas de glicil-glicina. Os membros dessa família são divididos em duas subclasses baseadas na homologia das sequências: a família M23A e família M23B (ZHENG et al., 2016).

Após o sequenciamento de *X. citri* subsp. *citri* 306 realizado por da Silva et al. (2002), vários genes vêm sendo estudados na busca de esclarecer o patossistema Xac-Citros. Por meio desse sequenciamento foram identificadas nove ORFs que possuem o domínio Peptidase_M23, que são: XAC0024 (proteína hipotética), XAC0466 (enzima lítica), XAC0787 (peptidase), XAC1728 (lipoproteína-NlpD), XAC2361 (peptidase), XAC2928 (peptidase), XAC3041 (proteína hipotética), XAC3368 (proteína hipotética) e XAC3898 (proteína hipotética).

A ORF XAC0466 faz parte de um grupo de seis proteínas XVIPs (*Xanthomonas* VirD4-interacting proteins) que são toxinas segregadas pelo T4SS (sistema de secreção tipo IV) de *Xanthomonas*, que tem como função matar outras células bacterianas, proporcionando assim, uma vantagem de crescimento competitivo em comunidades bacterianas misturadas (SOUZA et al., 2015).

No trabalho desenvolvido por Yang et al. (2018), a ORF XC2522 de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) estirpe 8004 foi nomeada NlpD baseada na identidade de 59% dos amino ácidos com o gene NlpD de *E. coli*. A mutação neste gene em *Xcc* ocasionou a ausência completa dos sintomas de podridão negra em folhas de rabanete (*Raphanus sativus*). Os resultados obtidos por estes pesquisadores demonstraram que o NlpD de *Xcc* afeta a divisão celular pela ativação da degradação do peptidoglicano por AmiC1, além de estar relacionado a virulência e ao T3S (Sistema de secreção tipo III). Esta ORF apresenta 92% de identidade dos seus aminoácidos com a ORF XAC1728 de *Xac306*, que por sua vez apresenta 60% de identidade com o gene NlpD de *E. coli*.

O mutante Δ XAC3368, obtido por Ferreira et al. (2017) por meio da inserção do transposon Tn5, foi incapaz de induzir hiperplasia, levando a uma necrose reduzida nos dois hospedeiros avaliados (*C. sinensis* e *C. limonia*). A ORF XAC3368 tem se mostrado específica do gênero *Xanthomonas*, e além do domínio Peptidase_M23,

apresenta o domínio ATPase_gene1 que codifica um pequeno peptídeo, com cerca de 100 aminoácidos, com uma longa cauda hidrofóbica, encontrado em vários genomas bacterianos e provavelmente possui função enzimática (FERREIRA et al., 2017). Na mutação na ORF XAC0024 realizada por Martins (2016), por meio de mutação sítio-dirigida, também foi possível observar uma redução significativa na virulência e desenvolvimento dos sintomas no hospedeiro limoeiro cravo.

As bactérias dispõem de uma série de mecanismos que atuam no processo de infecção e estabelecimento da doença e que influenciam direta ou indiretamente na virulência. Em *Xac* os principais mecanismos são: secreção de efetores, formação de biofilme, agregação, produção de goma xanthana e motilidade. Os fatores de virulência como exopolissacarídeos (EPS), lipopolissacarídeos (LPS), enzimas extracelulares, enzimas degradativas, adesinas e o sistema de secreção tipo III e seus efetores são fundamentais para o processo de infecção (DARRASSE et al., 2013; TIAN et al., 2015).

A mutação na ORF XAC2361 não provocou alteração na expressão dos sintomas de cancro no hospedeiro limoeiro cravo, porém, nas análises *in vitro*, observou-se alterações no fenótipo como: menor capacidade de crescimento *in vitro*, menor capacidade de sobrevivência em SDS e menor motilidade em relação a estirpe selvagem. A menor capacidade de motilidade observada no mutante Δ XAC2361 não alterou a capacidade de infecção e estabelecimento da doença, visto que o método de inoculação por infiltração não ofereceu dificuldades para a colonização inicial da bactéria. Uma hipótese a ser considerada seria a relação dessa proteína na formação e/ou funcionalidade dos flagelos.

As bactérias utilizam vários mecanismos de motilidade para colonizar ambientes incluindo os tipos *swimming*, *swarming* (dependentes de flagelos), *twitching*, *gliding* e *sliding* (não dependentes de flagelo) (GOTTIG et al., 2009). Em geral, bactérias do gênero *Xanthomonas* possuem um único flagelo polar. Moreira et al. (2010) confirmaram, por meio de microscopia e avaliação de motilidade, a presença e funcionalidade do flagelo em *Xac*.

Yang et al. (2009) ao examinarem o sequenciamento do genoma de *X. campestris* pv. *campestris* ATCC 33913 encontraram mais de 40 genes, possivelmente, envolvidos na biogênese flagelar e motilidade. Enquanto que em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* o sequenciamento genômico revelou que existem mais de 60 genes que codificam o conjunto completo de componentes para biogênese

flagelar. Porém como o sistema flagelar é regulado, e como esse tipo de motilidade está relacionado à patogênese ainda não está bem esclarecido, apesar de saber-se que facilita a formação de biofilme, a colonização e a fixação no tecido hospedeiro (TIAN et al., 2015).

Em seu estudo, Sena-Vélez et al. (2015) sugeriram que a formação de biofilme não é um passo essencial no ciclo da doença, mas atua como facilitador na entrada e estabelecimento da bactéria na câmara subestomatal. Tanto os tipos de motilidade dependente de flagelos quanto os não dependentes são necessários na formação de biofilme maduro de uma grande variedade de bactérias, incluindo *Xac* (LI e WANG, 2011b). Malamud et al. (2011) verificaram que houve uma redução na capacidade de formação do biofilme e na capacidade da bactéria aderir-se a superfícies abióticas quando realizadas mutações nos genes *fliC* e *flgE*, que codificam os flagelos em *Xac*, confirmando que os flagelos são importantes na formação do biofilme maduro, crescimento bacteriano e desenvolvimento do cancro cítrico.

Devido a presença do domínio NlpD, que é caracterizado como lipoproteína de membrana externa, além da presença de peptídeo sinal nas duas ORFs avaliadas neste trabalho, o que indica que as proteínas expressadas sejam secretadas para o periplasma, foi realizado o teste de sobrevivência ao detergente SDS. Esta análise demonstrou uma menor capacidade de sobrevivência do mutante $\Delta XAC2361$. Ficarra et al. (2016) avaliaram o gene *OprB* que codifica uma porina de membrana externa em *Xac*, o mutante para este gene apresentou menor capacidade de sobrevivência em relação a estirpe selvagem, o que pode sugerir que ocorreu alterações na estrutura da membrana, já que a resistência ao SDS é um importante ensaio para avaliar a estabilidade da membrana.

A mutação na ORF XAC3898 resultou na alteração da expressão dos sintomas do cancro, onde houve uma acentuada redução da virulência e, conseqüentemente, menor capacidade de crescimento e desenvolvimento da doença *in planta*, quando avaliado em limoeiro cravo. Além disso, nas análises *in vitro* foram observadas outras alterações no fenótipo como: maior capacidade de crescimento *in vitro*, maior produção de biofilme, maior produção de goma xanthana, porém uma menor capacidade de agregação em relação a estirpe selvagem. Ainda foi possível observar por meio de microscopia eletrônica de varredura, que houve uma redução no comprimento das células, mas mantendo ainda, o formato baciliforme.

A maior produção de goma xanthana e de biofilme verificada no mutante $\Delta XAC3898$ pode estar relacionada a menor capacidade de agregação das células, como forma de compensar essa deficiência, proporcionando maiores condições de sobrevivência no hospedeiro. De acordo com Sena-Vélez et al. (2015) uma maior produção de biofilme pode estar relacionada a uma menor tolerância aos estresses bióticos e abióticos. O mutante $\Delta XAC0024$ obtido por Martins (2016) também apresentou uma menor capacidade de agregação célula a célula, assim como uma maior produção de goma xanthana.

A agregação das células e a formação de biofilme por bactérias fitopatogênicas ocorre em estágios iniciais da colonização da planta quando a bactéria é submetida a maiores estresses bióticos e abióticos (REDONDO et al., 2015). Rigano et al. (2007) investigaram, por meio de marcação com GFP, se as células de *Xac* estavam presentes dentro de uma estrutura de biofilme durante o desenvolvimento do cancro em limão. Desse modo conseguiram visualizar agregados de bactérias ao longo do desenvolvimento da doença, tais agregados formaram uma estrutura tridimensional, com as células conectadas pela matriz de biofilme. No entanto, quando a bactéria mutante *gumB*, foi submetida a mesma avaliação, não foi observada a formação desses agregados, indicando que o EPS é necessário para a formação dessa estrutura, a qual pode proporcionar um ótimo ambiente para o desenvolvimento do cancro cítrico.

A agregação é essencial para a sobrevivência da bactéria no hospedeiro, Monier e Lindow (2003) observaram que altas populações *Pseudomonas syringae* sobreviveram na superfície foliar em boas condições de umidade sem depender da agregação. No entanto, após dessecação, as populações estressadas foram significativamente reduzidas e as células viáveis estavam localizadas principalmente nos agregados.

O biofilme bacteriano é definido como uma comunidade estruturada de células bacterianas unidas por uma matriz polimérica e aderidas a uma superfície inerte ou viva que, geralmente, é composta por polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Em *Xac*, essa matriz polimérica é formada pela adesina *XacFhaB* e exopolissacarídeos (EPS) também conhecida como goma xanthana (GOTTIG et al., 2010). A formação de biofilme é uma característica relacionada à virulência observada em muitas bactérias, desempenhando um papel importante nas interações

hospedeiro-patógeno, tendo como função a adesão e proteção das bactérias contra agentes bióticos e abióticos (SENA-VÉLEZ et al., 2015; YAN e WANG, 2011).

Um agrupamento de genes para a biossíntese de EPS, conhecida como a região *gum*, é composto de 12 genes que são expressos, geralmente, como um único operon. Os produtos dos genes *gum* são responsáveis pela montagem e polimerização de subunidades do açúcar e, em seguida, a secreção do polímero formado. Estudos tem mostrado que a goma xanthana pode ser um importante determinante da virulência em *Xanthomonas*. Além disso, o EPS pode mascarar as bactérias a fim de evitar o reconhecimento e respostas de defesa das plantas (CHAN e GOODWIN, 1999).

Em um estudo funcional do gene *GumD*, Dunger et al. (2007) verificaram que a goma xanthana não desempenha um papel essencial nos estádios iniciais da infecção, mas facilita a manutenção de bactérias na planta hospedeira, possivelmente melhorando a colonização de tecidos distantes.

Bonis et al. (2010) realizaram a mutação de um gene de *Helicobacter pylori*, pertencente à família das metalopeptidases M23B, o que ocasionou alterações no fenótipo, tais como redução do crescimento, baixa adesão as células alvo e menor motilidade em ambiente viscoso, além de observarem, por meio de microscopia eletrônica de varredura, alterações no formato das células, onde houve uma diminuição significativa do comprimento das células, acompanhado de um leve aumento da largura. O mesmo tipo de alteração de formato foi encontrado para a mutação na ORF XAC3898.

Esson et al. (2017) realizaram mutação em dois genes (CJJ81176_1105 e CJM1_1064) de *Campylobacter jejuni* que apresentam o domínio Peptidase_M23. Os mutantes obtidos apresentaram alteração no formato das células, que apresentaram uma perda da curvatura, não chegando a ter o formato de bastonete, mas perdendo o seu formato helicoidal característico.

Sycuro et al. (2010) identificaram quatro genes que possuem o domínio Peptidase_M23 (*csd* 1–3 e *ccmA*) que afetam exclusivamente morfogênese celular das bactérias, em *H. pylori*. Os mutantes para os quatro genes apresentaram diferenças no formato das células, perdendo sua característica helicoidal típica. Esses autores sugerem, que estas proteínas influenciam nas ligações peptídicas do PG, onde três destas codificam homólogos de peptidase LytM, indicando que podem ser

endopeptidases e/ou carboxipeptidases que hidrolisam diretamente as ligações peptídicas do PG ou de alguma forma modificam o PG.

Além do domínio Peptidase_M23, a ORF XAC3898 possui o domínio OapA que está dentro da superfamília LysM. O gene OapA em *H. influenzae* expressa uma proteína de envelope celular necessária para a expressão do fenótipo transparente da colônia e sua mutação alterou a capacidade de colonização da nasofaringe de ratos jovens (WEISER et al., 1995). O domínio LysM foi descoberto pela primeira vez na lisozima do fago ϕ 29 de *Bacillus*, é comumente encontrado em mais de 4.000 proteínas de procariotos e eucariotos. Muitas proteínas bacterianas contendo LysM são hidrolases de peptidoglicano, tais como p60, Sep, LytF, AcmA e Mur. A mais bem caracterizada proteína é a N-acetilglucosaminidase AcmA de *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. AcmA é uma autolisina necessária para separação celular e lise celular durante a fase estacionária de *L. lactis* (HU et al., 2010).

Na análise de microscopia de fluorescência da proteína de fusão XAC2361-mCherry foi possível observar predominantemente uma fluorescência dispersa por toda a célula. Este padrão de fluorescência não é compatível com proteínas de periplasma, de acordo com o que foi observado por Seitz et al. (2014) em células de *Vibrio cholerae*, onde a fluorescência concentra-se contornando o citoplasma. El Khatib et al. (2016) observaram padrões de fluorescência diferentes, com GFP, para localização no citoplasma e periplasma das proteínas expressadas pelos genes rsEGFP2, rsFolder and rsFolder2 em *E. coli*, quando as proteínas estão localizadas no citoplasma a fluorescência é emitida por toda a célula, enquanto que no periplasma a fluorescência concentra-se nas extremidades. No entanto, não foi possível confirmar a expressão da proteína de fusão XAC2361-mCherry pela técnica de Western blot, não validando os resultados obtidos pela microscopia de fluorescência.

7 CONCLUSÃO

Contudo, pode-se concluir que a mutação realizada na ORF XAC2361 não foi determinante no desenvolvimento da doença *in planta*. Enquanto que, a deleção parcial da ORF XAC3898, resultou na perda da virulência, causando a redução dos sintomas *in planta*, além de causar outras alterações no fenótipo quando avaliadas *in vitro*. A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstrou que houve uma redução no comprimento das células do mutante da ORF XAC3898, indicando que a proteína é essencial para a formação do peptidoglicano, que confere o formato das células bacterianas. Embora a proteína XAC3898 tenha se mostrado essencial para a virulência da *Xac*, não sabemos ainda qual o seu papel exato neste processo. Uma das abordagens que poderia dar pistas sobre o seu mecanismo de ação seria verificar a qual(ais) proteínas de *Xac* ela se associa. Diante dos resultados obtidos, sugere-se que domínio Peptidase_M23 está de alguma forma envolvido com a virulência e/ou patogenicidade de *Xac*, atuando na formação da parede celular.

Não foi possível identificar para que local da célula a proteína expressada pela ORF XAC2361 é endereçada. Já que a expressão da proteína de fusão não foi confirmada.

8 REFERÊNCIAS

AGRIFANUAL 2017: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2017. p. 229-235.

AZEVÊDO, C. L. L. **Sistema de Produção de Citros para o Nordeste**. Cruz das Almas: Embrapa: CNPMF, 2003. 49 p. (Embrapa-CNPMF. Sistema de Produção, 16).

BAGOS, P. G.; NIKOLAOU, E. P.; LIAKOPOULOS, T. D.; TSIRIGOS, K. D. Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. **Bioinformatics**, v. 26, n. 22, p. 2811–2817, 2010.

BAMFORD, C. V.; FRANCESCUTTI, T.; CAMERON, C. E.; JENKINSON, H. F.; DYMOCK, D. Characterization of a novel family of fibronectin-binding proteins with M23 peptidase domains from *Treponema denticola*. **Molecular Oral Microbiology**, Louisville, v. 25, p. 369–383, 2010.

BATEMAN, A.; BYCROFT M. The Structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). **Journal of Molecular Biology**, v. 299, p. 1113-1119, 2000.

BEHLAU, F.; BELASQUE JÚNIOR. **Cancro cítrico: a doença e seu controle**. Fundecitrus, 1ª Ed., Araraquara-SP, 2014, 82 p.

BEHLAU, F.; SALA, I.; BASSANEZI, R. B. **CANCRO CÍTRICO: Medidas essenciais de controle**, Fundecitrus, 3ª Ed. Atualizada, Araraquara-SP, 2017.

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

BONIS, M.; ECOBICHON, C.; GUADAGNINI, S.; PRÉVOST, M. C.; BONECA, I. G. A M23B family metallopeptidase of *Helicobacter pylori* required for cell shape, pole formation and virulence. **Molecular Microbiology**, Michigan, v. 78, n. 4, p. 809-819, 2010.

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

BÜTTNER, D.; BONAS, U. Regulation and secretion of *Xanthomonas* virulence factors. **FEMS Microbiol Rev**, Halle-Wittenberg, n. 34, p. 107-133, 2010.

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

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

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Laranja**, Terceiro Levantamento. Brasília: CONAB, 2013. 11 p.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N.; BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p. 315-324, 2006.

CHAN, J. W. Y. F.; GOODWIN, P. H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 489–508, 1999.

DARRASSE, A.; CARRÈRE, S.; BARBE, V.; BOUREAU, T.; ARRIETA-ORTIZ, M. L.; BONNEAU, S.; BRIAND, M.; BRIN, C.; COCIANCICH, S.; DURAND, K.; FOUTEAU, S.; GAGNEVIN, L.; GUÉRIN, F.; GUY, E.; INDIANA, A.; KOEBNIK, R.; LAUBER, E.; MUNOZ, A.; NOËL, L. D.; PIERETTI, I.; POUSSIER, S.; PRUVOST, O.; ROBÈNE-SOUSTRADE, I.; ROTT, P.; ROYER, M.; SERRES-GIARDI, L.; SZUREK, B.; SLUYS, M. V.; VERDIER, V.; VERNIÈRE, C.; ARLAT, M.; MANCEAU, C.; JACQUES, M. Genome sequence of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* strain 4834-R reveals that flagellar motility is not a general feature of xanthomonads. **BMC Genomics**, New York, v. 14, n. 761, 2013, doi:10.1186/1471-2164-14-761.

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

DO AMARAL, A. M.; TOLEDO, C. P.; BAPTISTA, J. C.; MACHADO, M. A. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 30, n.3, p.292-294, 2005.

DORELLA, F. A.; MIYOSHI, A.; PONTES, D. S.; AZEVEDO, V. Expressão e endereçamento de proteínas heterólogas em *Lactococcus lactis*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 2, n. 1, p. 123-132, 2003.

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

EL KHATIB, M.; MARTINS, A.; BOURGEOIS, D.; COLLETIER, J. P.; ADAM, V. Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for superresolution imaging of the bacterial periplasm. **Nature Scientific Reports**, 6:18459 | DOI: 10.1038/srep18459, 2016.

ESSON, D.; GUPTA, S.; BAILEY, D.; WIGLEY, P.; WEDLEY, A.; MATHER, A. E.; MERIC, G.; MASTROENI, P.; SHEPPARD, S. K.; THOMSON, N. R.; PARKHILL, J.; MASKELL, D. J.; CHRISTIE, G.; GRANT, A. J. Identification and initial characterisation of a protein involved in *Campylobacter jejuni* cell shape. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 202-211, 2017.

ERENCE, C. M.; GOCHEZ, A. M.; BEHLAU, F.; WANG, N.; GRAHAM, J. H.; JONES, J. B. Recent advances in understanding *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathogenesis and citrus canker disease management. **Molecular Plant Pathology**, Florida. Accepted Author Manuscript. doi:10.1111/mpp.12638.

FERREIRA, C. B.; MOREIRA, L. M.; BRIGATI, J. B.; LIMA, L. L.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; DE OLIVEIRA, J. C. F. Identification of new genes related to virulence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* during citrus host interactions. **Advances in Microbiology**, v. 7, p. 22-46, 2017.

FICARRA, F. A.; GRANDELLIS, C.; GALVAN, E. M.; IELPI, L.; FEIL, R.; LUNN, J. E.; GOTTIG, N.; OTTADO, J. *Xanthomonas citri* ssp. *citri* requires the outer membrane porin OprB for maximal virulence and biofilm formation. **Molecular Plant Pathology**, Florida, v. 18, n. 5, p. 720–733, 2017.

FUNDECITRUS: **Cancro cítrico**. Manual técnico, 2008. Disponível em: http://www.cda.sp.gov.br/greening/lnk_cancro_ctr/downloads/cancro-citrico.pdf

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Secretaria da Agricultura de São Paulo muda lei de controle de cancro cítrico. In: **Comunicação**, 2013. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias>>. Acesso em: 25/09/2017

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. **PLoS ONE**, Rosario, v. 4, n. 2, e4358, 2009.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ZIMARO, T.; SGRO, G. G.; FICARRA, F. A.; DUNGER, G.; DAURELIO, L. D.; THOMAS, L.; GEHRING, C.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. **Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease**. In MENDZ-VILAS A. Current Research, Technology and Education Topics Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, formatex Research Center: Badajoz. p. 196-204, 2010.

GUO, Y. Characterization of virulence traits and the underlying regulatory mechanisms of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2011. Dissertação Preview. Universidade da Florida.

HEIJNE, G. Y. The Signal Peptide. **Journal of Membrane Biology**. v. 115, p. 195-201, 1990.

HECKMAN, K. L.; PEASE, L. R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 924-932, 2007.

HO, S. N.; HUNT, H. D.; HORTON, R. M.; PULLEN, J. K.; PEASE, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, New York, v. 77, p. 51-59, 1989.

HU, S.; KONG, J.; KONG, W.; GUO, T.; JI M. Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. **Applied And Environmental Microbiology**, Baroda, v. 76, n. 8, p. 2410–2418, 2010.

JACIANI, F. J.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T.; VERNIÈRE, C.; PRUVOST, O.; BELASQUE JR, J. Genetic diversity of a brazilian strain collection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* based on the type III effector protein genes. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 193-203, 2012.

JALAN, N.; KUMAR, D.; ANDRADE, M. O.; YU, F.; JONES, J. B.; GRAHAM, J. H.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; WANG, N. Comparative genomic and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics**, New York, v. 14, p. 551, 2013.

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

LACERDA, L. A. **Sistema para depleção de proteínas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 2015. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Câmpus de Rio Claro. Rio Claro, 2015.

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

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

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

LESLEY, J. A.; SHAPIRO, L. SpoT regulates DnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, Boston, v. 190, n. 20, p. 6867–6880, 2008.

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

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

LI, T.; LIU, B.; CHEN, C. Y.; YANG, B. TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicide-resistant rice. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 43, n. 5, p. 297-305, 2016.

LO, Y. M.; YANG, S. T.; MIN, D. B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 689-694, 1997.

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

LORENZONI, A. S. G.; DANTAS, G. C.; BERGSMA, T.; FERREIRA, H.; SCHEFFERS, D. J. *Xanthomonas citri* MinC oscillates from pole to pole to ensure proper cell division and shape. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1352, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01352

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

MARTINS, T. Z. **Mutagênese sítio-dirigida da ORF XAC0024 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e suas implicações no desenvolvimento do cancro cítrico**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

MONIER, J. M.; LINDOW, S. E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. **PNAS**, v. 100, n. 26, p. 15977–15982, 2003.

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

NATALE, P.; BRÜSER, T.; DRIESSEN, A. J. M. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—Distinct translocases and mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1778, p. 1735–1756, 2008.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=8SXJ6KAR01R&mode=al> | Acessado em: 07/10/2017.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=8SX25PR901R&mode=al> | Acessado em: 07/10/2017.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **Retrato da Citricultura Brasileira**. Ribeirão Preto: MARKESTRAT - Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia, 2010. 137 p.

OKUMURA, A.; SUZUKI, T.; MIYATAKE, H.; OKABE, T.; HASHIMOTO, Y.; MIYAKAWA, T.; ZHENG, H.; UNOKI-KUBOTA, H.; OHNO, H.; DOHMAE, N.; KABURAGI, Y.; MIYAZAKI, Y.; TANOKURA, M.; YAMAGOE, S. Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 is a zinc-binding protein. **FEBS Letters**, Tokyo, v. 587, p. 404-409, 2013.

OLIVEIRA, R. P. **Biotecnologia em citros**. EMBRAPA Documentos. Pelotas, RS, 2006.

OLIVEIRA, R. P.; BUENO, B.; SCIVITTARO, W. B.; KOLLER, O. C.; ROCHA, P. S. G. **Cancro cítrico: epidemiologia e controle**. EMBRAPA Documentos. Pelotas, RS, 2008.

RANSOM, E. M.; ELLERMEIER, C. D.; Weiss, D. S. Use of mCherry red fluorescent protein for studies of protein localization and gene expression in *Clostridium difficile*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baroda, v. 81, n. 5, 2015.

REDONDO, C.; SENA-VELEZ, M.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; SABUQUILLO, P.; GRAHAM, J. H.; CUBERO, J. Influence of selected bactericides on biofilm formation and viability of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Crop Protection**, v. 78, p. 204-213, 2015.

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

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

ROSSETTO, M. P.; AZEVEDO, F. A.; MARTELLI, I. B.; SCHINOR, E. H. Avaliação da mancha preta dos citros em diferentes variedades de laranja doce. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p.58-63, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

SAWANO, A.; MIYAWAKI, A. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. **Nucleic Acids Research**. v. 28, n. 16, e. 78, 2000.

SEITZ, P.; MODARRES, H. P.; BORGEAUD, S.; BULUSHEV, R. D.; STEINBOCK, L. J.; RADENOVIC, A.; PERARO, M. D.; BLOKESCH, M. *ComEA* is essential for the transfer of external DNA into the periplasm in naturally transformable *Vibrio cholerae* cells. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 1, e100406, 2014.

SENA-VÉLEZ, M.; REDONDO, C.; GELL, I.; FERRAGUD, E.; JOHNSON, E.; GRAHAM, J. H. CUBERO, J. Biofilm formation and motility of *Xanthomonas* strains with different citrus host range. **Plant Pathology**, v. 64, p. 767–775, 2015.

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. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/ncomms7453>> doi: 10.1038/ncomms7453.

STADLER, C.; REXHEPAJ, E.; SINGAN, V. R.; MURPHY, R. F.; PEPPERKOK, R.; UHLÉN, M.; JEREMY C SIMPSON, J. C.; LUNDBERG, E. Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. **Nature Methods**, v. 10, n. 4, p. 315-323 doi: 10.1038/nmeth.2377

SUDIARTA, I. P.; FUKUSHIMA, T.; SEKIGUCHI, J. *Bacillus subtilis* CwIP of the SP- β prophage has two novel peptidoglycan hydrolase domains, muramidase and cross-linkage digesting DD-endopeptidase. **Journal of Biological Chemistry**, Yamanashi, v. 285, n. 53, p. 41232–41243, 2010.

SYCURO, L. K.; PINCUS, Z.; GUTIERREZ, K. D.; BIBOY, J.; STERN, C. A.; VOLLMER, W.; SALAMA, N. R. Relaxation of peptidoglycan cross-linking promotes *Helicobacter pylori*'s helical shape and stomach colonization. **Cell**, v. 141, p. 822–833, 2010.

TIAN, F.; YU, C.; LI, H.; WU, X.; LI, B.; CHEN, H.; WU, M.; HE, C. Alternative sigma factor RpoN2 is required for flagellar motility and full virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Microbiological Research**, v. 170, p. 177–183, 2015.

TIDHAR, A.; FLASHNER, Y.; COHEN, S.; LEVI, Y.; ZAUBERMAN, A.; GUR, D.; AFTALION, M.; ELHANANY, E.; ZVI, A.; SHAFFERMAN, A.; MAMROUD, E. The NlpD lipoprotein is a novel *Yersinia pestis* virulence factor essential for the development of plague. **PLoS One**, Rosario, v. 4, n. 9, e7023, 2010.

TSANG, M. J.; YAKHNINA, A. A.; BERNHARDT, T. G. NlpD links cell wall remodeling and outer membrane invagination during cytokinesis in *Escherichia coli*. **PLoS Genetics**, v. 13, n. 7, 2017: e1006888. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006888>.

TSENG, T. T.; TYLER, B. M.; SETUBAL, J. C. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. **BMC Microbiology**, v. 9, 2009, doi:10.1186/1471-2180-9-S1-S2

UniProtKB - Q8PK16 (Q8PK16_XANAC) Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8PK16> Acessado em: 18 de novembro de 2017.

UniProtKB - X5DSL3 (X5DSL3_ANAMA) Disponível em:
<http://www.uniprot.org/uniprot/X5DSL3> Acessado em: 18 de novembro de 2017.

WANG, S. C. E.; WEST, L.; SHAPIRO, L. The bifunctional FtsK protein mediates chromosome partitioning and cell division in *Caulobacter*. **Journal of Bacteriology**, Boston, v. 188, n. 4, p. 1497–1508, 2006.

WEISER, J. N.; CHONG, S. T. H.; GREENBERG, D.; FONG, W. Identification and characterization of a cell envelope protein of *Haemophilus influenza* contributing to phase variation in colony opacity and nasopharyngeal colonization. **Molecular Microbiology**, Michigan, v. 17, n. 3, p. 555-564, 1995.

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

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

YANG, L. C.; GAN, Y. L.; YANG, L. Y.; JIANG, B. L.; TANG, J. L. Peptidoglycan hydrolysis mediated by the amidase AmiC and its LytM activator NlpD is critical for cell separation and virulence in the phytopathogen *Xanthomonas campestris*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 7, p. 1705–1718, 2018.

YANG, T. C.; LEU, Y. W.; HUI-CHEN CHANG-CHIEN, H. C.; HU, R. M. Flagellar biogenesis of *Xanthomonas campestris* requires the alternative sigma factors RpoN2 and FliA and is temporally regulated by FlhA, FlhB, and FlgM. **Journal of Bacteriology**, Boston, v. 191, n 7, p. 2266–2275, 2009.

ZILLI, G.; GARCIA, F. R. M. Análise faunística e flutuação populacional de moscas-das frutas (diptera, tephritidae) em pomar de *Citrus sinensis* no município de Chapecó, Santa Catarina. **Biodiversidade Pampeana**, Uruguiana, v. 8, n. 1, p. 39-45, 2010.

ZHENG, H.; MIYAKAWA, T.; SAWANO, Y.; ASANO, A.; OKUMURA, A.; YAMAGOE S.; TANOKURA, M. Crystal structure of human leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2) reveals a mechanistic basis of functional evolution in a mammalian protein with an M23 metalloendopeptidase fold. **Journal of biological chemistry**, Yamanashi, v. 291, p. 17133-17142, 2016.