

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES DE
Xanthomonas citri SUBSP. *citri* QUANTO À
PATOGENICIDADE**

Ana Carolina Buzinari da Silva

Bióloga

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES DE
Xanthomonas citri SUBSP. *citri* QUANTO À
PATOGENICIDADE**

Ana Carolina Buzinari da Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Co-orientador: Jesus Aparecido Ferro

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2014

Silva, Ana Carolina Buzinari da
S586a Análise de uma biblioteca de mutantes de *Xanthomonas citri* subsp.
citri quanto à patogenicidade / Ana Carolina Buzinari da Silva. --
Jaboticabal, 2014
x, 63 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro
Banca Examinadora: Flavia Maria de Souza Carvalho, Fabrício
José Jaciani
Bibliografia

1. Cancro cítrico. 2. Patogenicidade. 3. Mutagênese. 4.
Transposon. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.23:577,2

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES DE *Xanthomonas citri*
SUBSP. *citri* QUANTO À PATOGENICIDADE

AUTORA: ANA CAROLINA BUZINARI DA SILVA

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA INES TIRABOSCHI FERRO

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO

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

Profa. Dra. MARIA INES TIRABOSCHI FERRO

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. FLAVIA MARIA DE SOUZA CARVALHO

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. FABRICIO JOSÉ JACIANI

Fundo de Defesa da Citricultura / Araraquara/SP

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Ana Carolina Buzinari da Silva – nascida em 12 de Janeiro de 1987, no município de Jaboticabal, São Paulo, filha de Wanderley Aparecido da Silva e Elisabete Buzinari da Silva. Formou-se em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, em 2011. Realizou iniciação científica como bolsista no Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, com início no ano de 2008 e término em 2010. Em março de 2012 iniciou o mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/Jaboticabal).

“Que eu continue com vontade de viver, mesmo sabendo que a vida é, em muitos momentos, uma lição difícil de ser aprendida. Que eu permaneça com vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que, com as voltas do mundo, eles vão indo embora de nossas vidas. Que eu realmente sempre a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, sentir, entender ou utilizar essa ajuda. Que eu mantenha meu equilíbrio, mesmo sabendo que muitas coisas que vejo no mundo escurecem meus olhos. Que eu realmente a minha garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são ingredientes tão fortes quanto o sucesso e a alegria. Que eu atenda sempre mais à minha intuição, que sinaliza o que de mais autêntico eu possuo. Que eu pratique mais o sentimento de justiça, mesmo em meio à turbulência dos interesses. Que eu manifeste amor por minha família, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exige muito para manter sua harmonia. E, acima de tudo... Que eu lembre sempre que todos nós fazemos parte dessa maravilhosa teia chamada vida, criada por alguém bem superior a todos nós! E que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos de alguns e, sim, nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós! ”

Chico Xavier

Dedico com amor este trabalho,

Aos meus pais, Wanderley e Elisabete, por me apoiarem e incentivarem para que eu pudesse ir além e busca-se meus sonhos;

Ao meu namorado, Leandro, por seu companheirismo, compreensão, paciência e carinho. Obrigada por me apoiar, por estar ao meu lado em todos os momentos e por me incentivar a seguir em frente nos momentos de desânimo. Poder comemorar cada conquista ao seu lado foi o que fez tudo ter sentido. Amo você!

Aos meus irmãos, Ricardo e Kamila, e minha cunhada Laura, pelo carinho e incentivo;

Ao meu pequeno amor, meu sobrinho Rafael, que ainda nem faz ideia de quanto seu amor me ensinou e de quanta alegria trouxe à minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por guiar meus passos me dando a saúde necessária para que eu pudesse buscar meus sonhos, sempre superando as dificuldades que surgiram em meio à essa caminhada.

Aos meus familiares, por sempre trazerem leveza aos momentos de dificuldades e transformarem nossos encontros em lembranças agradáveis e divertidas.

À minha orientadora profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pelo carinho com que me recebeu, abrindo as portas de seu laboratório e me dando a oportunidade de realizar um sonho. Sou extremamente grata pelos valiosos conselhos e ensinamentos que tanto contribuíram para meu amadurecimento pessoal e profissional.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, com quem tive o prazer de conviver e aprender. É um orgulho poder trabalhar com quem faz ciência com tanto amor e dedicação.

Ao pesquisador e amigo Dr. Fabricio José Jaciani, à quem não tenho palavras para agradecer tamanha generosidade e paciência. Serei eternamente grata por todas as dúvidas sanadas, pela atenção e tempo dispensado a mim, assim como por sua amizade.

A Dra. Karina Maia Dabbas, pela confecção das células competentes e ajuda na elaboração da biblioteca de mutantes.

A Dra. Flavia Maria Souza Carvalho, pela participação na banca e por suas contribuições e sugestões que tanto enriqueceram o trabalho.

Ao prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, pela paciência em ensinar-me como analisar os dados de bioinformática.

Ao Prof. Dr. José Belasque Jr, pela orientação no cuidado com as plantas e por todas as sugestões ao longo deste trabalho.

Às queridas amigas, Claudênia Ferreira da Silva, por suas valiosas sugestões e correções durante a redação da dissertação, e Flavia Campos, pela ajuda com a tradução, por todo o apoio, carinho e companheirismo.

Ao amigo Rafael Marini, pela ajuda com as análises do sequenciamento.

Ao amigo Gustavo Claudiano, pelo incentivo e ajuda com as correções dos gráficos.

Às queridas amigas Daniele, Ângela, Jú Vantini, Claudênia, Flávia, Janaína, Aline Belesini, Bruna e Elaine, minhas eternas “imensinhas”, com quem dividi os mais diversos momentos ao longo desse período, mas do qual só guardo as boas e doces lembranças.

À amiga Lúcia Lopes, com quem muito aprendi e tive o prazer de conviver no início do mestrado.

À família LBM, com quem a convivência sempre foi a mais agradável: Lucília, Fernando, Aline Lopes, Flávia Carvalho, Raquel, Amanda, Juan, Sonia, Rafael, Gustavo, Larissa, Taísa, Ângela, Helen, Karina, Teresa, Jú Cavallini, Mayara, Gustavo Peron, Nayara, Lucas, Agda, Mariza e Renata.

Ao Fundo de Defesa de Citrucultura (Fundecitrus), pela disponibilidade do uso do laboratório e do autoplata, além do fornecimento das mudas de citros.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho, fica aqui o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A citricultura brasileira	3
2.2 Cancro cítrico	4
2.3 <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	6
2.4 Interação planta - patógeno	7
2.5 Sistema de transposição <i>in vitro</i>	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Células eletrocompetentes de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	10
3.2 Mutagênese <i>in vitro</i>	10
3.3 Caracterização patogênica.....	11
3.3.1 Testes de patogenicidade	11
3.3.2 Curva de crescimento bacteriano.....	12
3.4 Caracterização genética.....	13
3.4.1 Extração de DNA total de <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	13
3.4.2 Clivagem do DNA e clonagem	14
3.4.3 Transformação em <i>E. coli</i> linhagem DH10B.....	14
3.4.4 Extração do DNA plasmidial.....	15
3.4.5 Sequenciamento do gene mutado.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Caracterização genética e patogênica	17
5 CONCLUSÃO.....	37
6 REFERÊNCIAS	38

ANÁLISE DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* QUANTO À PATOGENICIDADE

Resumo - O estudo da interação planta-patógeno é de grande importância para o entendimento do cancro cítrico, justificando assim a busca por genes que estejam ligados a patogenicidade e virulência em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), agente causal dessa doença. Neste estudo, foi realizada mutagênese aleatória por inserção do transposon EZ-Tn5 *in vitro* no genoma da Xac. Obteve-se 8000 mutantes onde 292 foram conduzidos em ensaio experimental *in planta*. Cinco mutantes expressaram sintomatologia alterada, dois com ausência total de sintomas e três com leve hiperplasia. A análise da sequência dos genes onde se inseriu o transposon indicam mutações nos genes *purF*, *yapH*, *oar*, um gene que codifica uma proteína hipotética (XAC 0196), e na região entre os genes *pobB* (XAC0362) e *glpR* (XAC0361). As análises de curvas de crescimento bacteriano *in planta* demonstraram que, exceto o gene *purF*, todos os demais podem ser genes envolvidos na patogenicidade de Xac. Dois destes, *yapH* e *oar* são descritos como relacionados à adesividade bacteriana, evidenciando que a interferência nesse processo exerce influência direta no sucesso da infecção de Xac. Destaca-se também a importância da identificação de uma proteína hipotética, já que essa apresentou sintomatologia atenuada quando ocorreu a inserção do transposon.

Palavras-chave: cancro cítrico, mutagênese, patogenicidade, transposon

ANALYSIS OF A RELATED PATHOGENICITY MUTANT LIBRARY OF *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri*

Abstract – The study of plant-pathogen interaction is very important to citrus canker understanding, justifying the search for virulence and pathogenicity related genes in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), causal agent of this disease. In this study, a random mutagenesis by Tn5 transposon insertion into Xac's genome was performed. Eight thousand mutants were produced and 292 mutants were tested *in planta*. From those, five mutants expressed altered symptomatology, two showed complete absence of symptoms and three reduced hyperplasia. Gene sequences analysis where transposon was inserted, indicated mutations in *purF*, *yapH* and *oar* genes, in a region that codes for a hypothetical protein (XAC0196), and in a region between *pobB* (XAC0362) and *glpR* (XAC0361) genes. Analysis of bacteria growth curve *in planta* showed that, except for *purF* gene, all the others genes may be involved in Xac pathogenicity. Two of these genes, *yapH* and *oar*, are described as bacterial adhesion related genes, highlighting that interference in this process has direct influence in the Xac infection success. The importance of hypothetical protein identification is emphasized, since it presented attenuated symptomatology when mutated.

Key-words: citrus canker, mutagenesis, pathogenicity, transposon

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. O transposon EZ-Tn5 se insere no genoma de forma aleatória, sendo catalisada pela enzima transposase que reconhece o sítio específico presente nas extremidades do transposon (ME), criando a condição necessária (coesividade de pontas) para que haja a inserção do fragmento no DNA alvo.....9

Figura 2. Folha de lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) inoculada com isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, para avaliação do crescimento celular bacteriano após a infecção. Foram feitas quatro perfurações de cada lado da nervura central das folhas (A) e as porções de tecido vegetal circundantes à perfuração foram retiradas em discos de 1cm de diâmetro, a cada dia de avaliação (B).....13

Figura 3. Mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculados em folhas de laranjeira Pêra Rio (*Citrus sinensis*) após 30 dias de cultivo. Na porção abaxial ao lado esquerdo da nervura central a estirpe selvagem (isolado 306) e à direita os respectivos mutantes (A) XacM30, (B) XacM152, demonstrando ausência total de sintomas.....18

Figura 4. Mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculados em folhas de laranjeira Pêra Rio (*Citrus sinensis*) após 30 dias de cultivo. Na porção abaxial ao lado esquerdo da nervura central a estirpe selvagem (isolado 306) e à direita os respectivos mutantes: (A) XacM51, (B) XacM71, (C) XacM168 demonstrando leve hiperplasia dos tecidos.....18

Figura 5. Mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculados em folhas de lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) após 30 dias de cultivo. Na porção abaxial ao lado esquerdo da nervura central a estirpe selvagem (isolado 306) e à direita os respectivos mutantes (A) XacM30, (B) XacM152, (C) XacM51, (D) XacM71 e (E) XacM168, demonstrando ausência total de sintomas.....19

Figura 6. Localização da ORF XAC1032 no genoma da Xac. A ORF está localizada na fita senso do DNA genômico, compreendendo as bases 1189902 a 1191368.....19

Figura 7. Sequência de nucleotídeos da ORF XAC1032 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 1.190.836, como indicado na sequência por um triângulo vermelho invertido. O códon GTV~~G~~ interrompido após a segunda base codifica o aminoácido Valina (V). **ATG**: códon de iniciação de leitura; **TGA**: códon de terminação.....20

Figura 8. Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC1032 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção do transposon após a Asparagina (N) da posição 301, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido, interrompeu o códon do aminoácido Valina (V) 302, levando ao truncamento da proteína20

Figura 9. Domínios da proteína e local da inserção do transposon. A inserção do transposon ocorreu na porção N-terminal do domínio Fosforibosil Transferase, como indicado pelo triângulo vermelho invertido.....21

Figura 10. Curva de crescimento bacteriano do mutante XacM30, de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, inoculado em folhas de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*) (A) e laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis*) (B), por período de 13 dias, demonstrando baixa multiplicação das células do mutante a partir do primeiro dia após inoculação.....22

Figura 11. Curva de crescimento bacteriano de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306, e dos mutantes (A) XacM51, (B) XacM71, (C) XacM152 e (D) XAcM168. A curva de crescimento foi avaliada ao longo de 13 dias após a inoculação em folhas de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifoli*)23

Figura 12. Curva de crescimento bacteriano de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306, e dos mutantes (A) XacM51, (B) XacM71, (C) XacM152 e (D) XAcM168.

A curva de crescimento foi avaliada ao longo de 13 dias após a inoculação em folhas de laranjeira Pêra Rio (*Citrus sinensis*)23

Figura 13. Localização da ORF XAC4113 no genoma da Xac. A ORF está localizada na fita antisenso do DNA genômico, compreendendo as bases 4819965 a 4826966.....24

Figura 14. Sequência de nucleotídeos da ORF XAC4113 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 4819965, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido. A inserção ocorreu logo após o códon GCG que codifica o aminoácido Alanina. **ATG**: códon de iniciação de leitura; **TGA**: códon de terminação26

Figura 15. Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC4113 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção do transposon ocorreu logo após a Alanina (A) da posição 2.334, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido, levando ao truncamento da proteína27

Figura 16. Domínios da proteína XAC4113. A proteína apresenta um domínio **adhes** de atividade de hemaglutinação na extremidade aminoterminal e dois domínios **FhaB** encontrados em exoproteínas de grande tamanho envolvidas na utilização do grupo heme ou na adesão: um na porção aminoterminal e outro na porção carboxiterminal. A inserção do transposon EZ-Tn5 ocorreu após o aminoácido 2.334, na porção carboxiterminal da proteína, logo após o domínio **FhaB**, como indicado pelo triângulo vermelho invertido27

Figura 17. Localização das ORFs XAC0361 e XAC0362 no genoma da Xac. As ORFs XAC0361 (azul) e XAC 0362 (vermelha) estão localizadas na fita antisenso do DNA genômico, compreendendo as bases 431959 a 431189 e as bases 433493 a 432510 respectivamente. A seta rosa indica o local da inserção do transposon EZ-Tn5 no mutante30

Figura 18. Sequência de nucleotídeos das ORFs XAC0361 e XAC0362 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 432348, como

indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido, distante 162 bases do códon de terminação da ORF XAC0362 (região 3' não traduzida) e 388 bases do códon de iniciação da ORF XAC0361 (região 5' não traduzida). **ATG**: códon de iniciação de leitura da ORF XAC0362; e **TTG**: códon de iniciação de leitura da ORF XAC0362; **TGA**: códon de terminação30

Figura 19. Sequência de aminoácidos das proteínas codificadas pelas ORFs XAC0361 (A) e XAC0362 (B). A inserção do transposon EZ-Tn5 não afetou a sequência de aminoácidos das proteínas31

Figura 20. Domínios da proteína XAC0361. A proteína apresenta dois domínios conservados: um domínio de repressor do operon da desoxirribose na sua porção aminoterminal e domínio sensor DeoR na sua porção carboxiterminal. A inserção do transposon EZ-Tn5 não causou interrupção em nenhum destes domínios31

Figura 21. Domínios da proteína XAC0362. A proteína apresenta dois domínios conservados: um domínio de Ferredoxina redutase ligante de FAD na sua porção aminoterminal e um cluster ligante de ferro-enxofre (2Fe-2S) na sua porção carboxiterminal. A inserção do transposon EZ-Tn5 não causou interrupção em nenhum destes domínios31

Figura 22. Localização da ORF XAC2773 no genoma da Xac. A ORF está localizada na fita senso do DNA genômico, compreendendo as bases 3249880 a 325299032

Figura 23. Sequência de nucleotídeos da ORF XAC2773 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 3.249.593, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido. A inserção ocorreu na região regulatória 5' e não na região codificadora. **ATG**: códon de iniciação de leitura; **TGA**: códon de terminação33

Figura 24. Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC2773. A inserção do transposon EZ-Tn5 não afetou a sequência de aminoácidos da proteína34

Figura 25. Domínios da proteína XAC2773. A proteína apresenta dois domínios conservados: um domínio semelhante à carboxipeptidase regulatória na sua porção aminoterminal e um receptor putativo de membrana externa/domínio de porina (canal na membrana externa). A inserção do transposon EZ-Tn5 não causou disrupção em nenhum destes domínios34

Figura 26. Localização da ORF XAC0196 no genoma da Xac. A ORF está localizada na fita senso do DNA genômico, compreendendo as bases 241932 a 24236035

Figura 27. Sequência de nucleotídeos da ORF XAC0196 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 242072, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido. O códon C ∇ VTG interrompido após a primeira base codifica o aminoácido Leucina (L). **ATG**: códon de iniciação de leitura; **TGA**: códon de terminação35

Figura 28. Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC0196 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção do transposon interrompeu após a Glicina (G) da posição 51, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido, e interrompeu o códon do aminoácido Leucina (L) 52, levando ao truncamento da proteína36

Figura 29. Domínios da proteína e local da inserção do transposon. A inserção do transposon ocorreu na porção N-terminal do domínio Paal_tioesterase, como indicado pelo triângulo vermelho invertido36

1 INTRODUÇÃO

O cancro cítrico é uma das principais ameaças a cultura dos citros em todo o mundo. É provocado por diferentes bactérias do gênero *Xanthomonas*, onde suas diferentes formas são descritas com base na especificidade do patógeno e origem geográfica (SCHAAD et al., 2005; JACIANI, 2008).

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) é o agente causal do cancro cítrico e afeta todas as variedades comerciais de citros. É uma bactéria gram negativa que invade o tecido da planta hospedeira através dos estômatos ou ferimentos. Coloniza o espaço apoplástico de folhas, frutas e caules jovens causando sintomas de infecção como lesões necróticas e eruptivas. Na fase final, a epiderme dos tecidos vegetais é rompida devido à hiperplasia das células, induzida pelo agente patogênico, permitindo a dispersão da bactéria para outras plantas pela chuva ou pelo vento. Essa infecção induz uma variedade de sintomas incluindo a desfolha, perecimento e queda prematura de frutos reduzindo, assim, os rendimentos e, portanto, causando sérias perdas econômicas. Além disso, restrições de quarentena são impostas para a produção em áreas com cancro cítrico dificultando assim a comercialização de frutas frescas (DA SILVA et al., 2002; GRAHAM et al., 2004; FUNDECITRUS, 2014).

Um controle efetivo para o cancro cítrico é inexistente até o momento e mais detalhes a respeito da biologia do agente etiológico podem contribuir substancialmente para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle da infecção (MARTINS et al., 2010).

O genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) foi completamente sequenciado, mostrando assim a importância de genes e grupos de genes que regulam os mecanismos estratégicos da patogênese (DA SILVA et al., 2002). Alguns genes relevantes identificados em Xac são aqueles que codificam para a adesão bacteriana e a superfície de elementos estruturais, os sistemas de secreção de proteínas, toxinas de parede celular de plantas, enzimas degradantes e os envolvidos na resposta às bactérias de ambiente oxidativo que se encontram no tecido infectado (GOTTIG et al., 2010).

Com o genoma da Xac à disposição, inúmeras informações a respeito desse microrganismo ficaram disponíveis e deu-se início a diversos estudos moleculares onde a Xac foi adotada como um modelo de estudo. Genes envolvidos na patogênese e virulência de Xac vem sendo desenvolvidos com sucesso desde então, entre eles empregando-se a mutagênese aleatória por meio de inserção do transposon no genoma (LAIA et al., 2009).

Para melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da doença e o papel de genes envolvidos no processo de infecção bacteriana, o objetivo deste estudo foi obter mutantes que quando inoculados em espécies cítricas, apresentassem diminuições ou ausência na sintomatologia padrão do cancro cítrico. Para tanto, uma biblioteca de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi produzida a partir da inserção randômica do transposon EZ-Tn5 no genoma da bactéria.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A citricultura brasileira

A união de uma citricultura extremamente desenvolvida e uma indústria competitiva fez com que o Brasil se tornasse o maior produtor mundial de laranjas na década de 1980 (NEVES et al., 2010), tendo ainda hoje esse posto e sendo também o maior exportador do suco de laranja concentrado congelado (NEVES et al, 2010; ZULIAN et al, 2013).

A cultura da laranja é amplamente disseminada no Brasil por não existirem limitações climáticas para seu desenvolvimento, a não ser em regiões do Nordeste onde as chuvas não atingem 700mm por ano, e na região Sul onde há fortes incidências de geadas (RODRIGUEZ et al, 1991; CAMARGO et al, 2012).

A produção global de laranja fresca e de suco concentrado na safra 2011/2012 foi de 53,62 e 2,16 milhões de toneladas, respectivamente, com o Brasil sendo o responsável pela produção de 38,2% da laranja e 56,1% do suco (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2013). A safra total de laranja em 2013/2014 está estimada em 286,4 milhões de caixas de 40,8 quilos (CONAB, 2014).

O estado de São Paulo detém 80% da produção nacional de laranja e 53% da produção mundial de suco, constituindo-se como maior polo citrícola do mundo. Com um movimento financeiro anual de cerca de cinco bilhões de reais, representando a segunda atividade rural em importância no estado, menor apenas que a cana-de-açúcar, a citricultura paulista gera 400 mil empregos diretos, com 3 mil frentes de trabalho simultâneas na colheita (NEVES et al, 2007; NEVES, 2010; CAMARGO et al, 2012). Assim, a citricultura desempenha um papel importante tanto para o comércio externo como para a geração de emprego e renda interna.

Em levantamentos realizados pela Conab/CATI/IEA desde julho de 2010, nota-se que houve uma queda de aproximadamente 38% no número de citricultores paulistas no período. O impacto da crise que o setor vem vivendo na competitividade

e perfil da citricultura paulista para os próximos anos, ainda não se pode de fato ser medida, mas já é notado nos indicadores socioeconômicos das regiões produtoras.

Pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores nesta década. A mortalidade saltou de 4% para preocupantes 7,5%. Essas doenças foram responsáveis por perdas de quase 80 milhões de caixas por ano. Uma das preocupações mais sérias do setor é o greening, que avança com extrema rapidez e o cancro cítrico (NEVES et al., 2010). O cancro cítrico representa uma grande ameaça ao cultivo de laranja em larga escala e ocasionam perdas econômicas irreversíveis para a cultura, o que, somado ao impacto do câmbio aumentam o custo de produção da cultura, entretanto, até o momento não há nenhum método curativo para esta enfermidade (CONAB, 2014).

2.2 Cancro cítrico

O cancro cítrico é uma das mais graves doenças da cultura dos citros. Seu agente causal é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac), um dos fatores mais prejudiciais à cultura dos citros (CIVEROLO, 1984). Afeta todas as variedades cítricas de importância comercial, tais como laranjas (*Citrus sinensis*), limões (*C. limon*) e tangerinas (*C. reticulata*), além de plantas de outros gêneros da família Rutaceae (JACIANI, 2012).

A doença é endêmica na China, Japão, Índia, Argentina, Uruguai e Paraguai, que, a exceção do último, são importantes produtores mundiais (OLIVEIRA et al, 2008). No Brasil, a primeira constatação foi em 1957, no município de Presidente Prudente, São Paulo (BITANCOURT, 1957).

Na literatura são descritos três tipos de cancro cítrico: A, B e C. O tipo A, que causa mais dano econômico para a citricultura, é originário da Ásia e é causado pela *Xanthomonas citri* subsp *citri* (Xac), a qual é encontrada praticamente em todas as regiões onde já foi detectado o cancro cítrico e ataca todos os citros. Os tipos B e C são encontrados apenas na América do Sul. A cancrose B, presente na Argentina, Paraguai e Uruguai, tem como agente causal a *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo B (XauB), a qual infecta *Citrus limon* (limão) mas também é encontrada em *C. sinensis* (laranja doce) e *C. paradisi* (grapefruit ou toranja). A

cancrose C, presente no estado de São Paulo, é causada pela *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C (XauC), a qual ataca principalmente *C. aurantifolia* (Mexican lime ou lima ácida 'Galego' ou limão Galego) (BRUNINGS, GABRIEL, 2003; SCHAAD et al, 2006; MOREIRA et al., 2010).

Os sintomas mais evidentes do cancro são decorrentes de hiperplasia (aumento da divisão celular) e hipertrofia (aumento do volume celular), desencadeadas pelo patógeno ao alterar a transcrição de alguns genes do hospedeiro (CERNADAS et al., 2008). Os sintomas do cancro cítrico constituem-se em lesões circulares, corticosas, salientes e encharcadas, de coloração amarronzada e aspecto eruptivo, ocorrendo em folhas, ramos e frutos (ROSSETTI, 2001; BRUNINGS & GABRIEL, 2003). As características da doença incluem abscisão de frutos precoce e declínio geral da planta (GOTTWALD, GRAHAM, 2000).

O controle do cancro cítrico fundamenta-se principalmente em medidas de exclusão e erradicação (GOTTWALD et al, 2001; BELASQUE JR. et al, 2005). Recentemente no Estado de São Paulo houve um aumento preocupante no índice de contaminação por cancro cítrico devido a alteração na legislação estadual, segundo a qual deixou de ser obrigação erradicar todas as plantas de um talhão quando a incidência de plantas doentes fosse superior a 0,5%. Conforme levantamento de campo realizado pelo Fundecitrus em 2012, a incidência por cancro cítrico nos talhões paulistas passou de 0,14% para 1,39% de plantas contaminadas de 2009 a 2012 (FUNDECITRUS, 2014). A legislação manteve, no entanto, a obrigatoriedade de se erradicarem as árvores sintomáticas detectadas e as demais localizadas no raio de 30 metros (BELASQUE JR, et al 2009; ADAMI, MIRANDA 2014).

Atualmente, essa medida é questionada, e mudanças na legislação têm sido estudadas por causa do aumento alarmante nos índices de incidência dessa doença e pela viabilidade da medida. É importante ressaltar que, em São Paulo, no caso do cancro cítrico, não é permitido o convívio com a doença, sendo a erradicação a única alternativa imposta aos produtores paulistas (ADAMI, MIRANDA, 2014).

2.3 *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac) pertence ao gênero *Xanthomonas* e compõe o maior grupo de bactérias fitopatogênicas dispersos na natureza, com capacidade de infectar uma vasta gama de hospedeiros (HAYWARD, 1993).

É uma bactéria gram-negativa, aeróbia obrigatória, apresenta formato de bastonete com presença de um único flagelo polar e não forma esporos (BRUNINGS, GABRIEL, 2003). Uma das principais características dessas proteobactérias é a produção do polissacarídeo goma xantana e do pigmento amarelo das colônias, denominado xantomonadina (STALL, CIVEROLO, 1991).

A bactéria pode sobreviver e se multiplicar fora do hospedeiro como epífita. Mas, uma vez em contato com estômatos, hidatódios, poros de água, ou lesões de tecidos vegetais e com um ambiente propício para entrada e colonização dos tecidos, a bactéria coloniza o mesofilo causando os sintomas de cancro em plantas hospedeiras (MOREIRA et al., 2004).

A identificação e o isolamento primários de Xac foram feitos por Clara Hasse (1915) que, após provar a patogenicidade dessa bactéria, classificou-a como *Pseudomonas citri*. Aproximadamente 80 anos depois houve uma reclassificação e a mudança para *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et al., 1995; HARTUNG et al. 1996). Mais recentemente, em 2006, Schaad e colaboradores alteraram o nome para *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Essa recente reclassificação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros foi baseada em análises do espaço intergênico 16S-23S, AFLP e re-associação DNA-DNA.

Xanthomonas fitopatogênicas a citros eram pertencentes a uma mesma espécie bacteriana (*Xanthomonas axonopodis*) e separadas em patovares (*citri*, *aurantifolii* e *citrumelo*) (VAUTERIN et al., 1995). A classificação atual considera esses organismos como sendo pertencentes a três espécies distintas: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (antes *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (antes *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*) e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (antes *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*) (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006).

Embora com a mudança de nomenclatura, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é ainda hoje amplamente conhecida e encontrada na literatura pela denominação *Xac*, já que quando foi finalizado o sequenciamento completo do seu genoma em 2002 (DA SILVA et al, 2002) seu nome ainda era *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*).

2.4 Interação planta - patógeno

As plantas estão sempre expostas ao ataque de organismos patogênicos. Contudo, elas desenvolvem estratégias de defesa incluindo respostas de longo e curto prazo. Tais respostas decorrem da percepção de sinais extracelulares e na sua transdução dentro das células vegetais e entre elas mesmas.

As interações entre plantas e fitopatógenos podem ser compatíveis ou incompatíveis. Na interação compatível o patógeno é capaz de mascarar ou reprimir os mecanismos de defesa do hospedeiro podendo seguir seu desenvolvimento nos tecidos vegetais e colonizar a planta hospedeira. A manifestação da doença ocorre por meio de mecanismos que envolvem a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta, o qual são capazes de modular, interferir ou suprimir as respostas de defesa da planta (WHITE et al., 2000).

Na interação incompatível, ao penetrar o tecido vegetal, o patógeno é reconhecido e restringido ao sítio de infecção. A incompatibilidade acontece quando genes de resistência da planta codificam proteínas receptoras (R) capazes de interagir especificamente com proteínas efectoras (Avr) codificadas por genes de avirulência (*avr*) presentes no patógeno. Após detectarem a presença do patógeno, as plantas respondem ao ataque pela indução de proteínas de defesa, frequentemente gerando rápida morte de células no local da infecção, chamada de reação de hipersensibilidade (HR), impossibilitando a propagação do patógeno para outros tecidos da planta. Deste modo, de acordo com essas interações, quando a planta é resistente, o patógeno é dito avirulento e a interação é incompatível. Por outro lado, quando a planta é susceptível, o patógeno é denominado virulento e a

interação é compatível (STASKAWICZ et al, 1995; GACHOMO et al, 2003; AGRIOS, 2005).

O patógeno requer um equilíbrio na produção de enzimas e metabólitos durante sua patogênese, já que não consegue colonizar por meio de forças físicas as estruturas de seu hospedeiro. Para que esse equilíbrio aconteça são necessários dois pontos. Primeiramente o ambiente deve ser favorável à colonização da bactéria para que a mesma possa se multiplicar constantemente. Ao mesmo tempo, os fatores de virulência devem ser produzidos de forma controlada, de maneira que ocorram quando uma quantidade suficiente de bactérias esteja presente nos tecidos do hospedeiro. Desta forma, o ambiente permanecendo favorável a multiplicação bacteriana, estas poderão ter uma população grande o suficiente para colonizar o tecido vegetal e empregar os mecanismos de virulência de maneira eficiente e conjunta (WULLF, 2003; BUTTNER, BONAS, 2010).

A diferença entre as interações compatíveis e incompatíveis está relacionada à presença e funcionalidade dos genes de resistência na planta e de virulência no patógeno. A evolução das interações gene-a-gene tem como consequência uma diversidade de genes R em diferentes indivíduos de uma espécie hospedeira e uma correspondente diversidade de genes de avirulência em diferentes raças do patógeno (STASKAWICZ et al, 1995; JACIANI, 2012).

2.5 Sistema de transposição *in vitro*

Em biologia molecular, um método padrão para determinar genes de função desconhecidas e estabelecer quais são essenciais sob determinadas condições ambientais, pode ser por meio da interrupção gênica e determinação da mudança fenotípica (RUIZ et al., 2013).

O sistema de transposição é um método eficiente e que ocorre de maneira simples, favorecendo estudos de genômica funcional (ROTT et al., 2010). Um transposon é uma pequena sequência nucleotídica que se insere em outras moléculas de DNA por meio de uma reação catalisada por uma enzima, a transposase (GORYSHIN et al., 2000). Possui uma sequência de 19 pares de bases

especificamente e exclusivamente reconhecida pela transposase em cada uma de suas extremidades (Figura 1) (GORYSHIN, REZNIKOFF 1998; EPIBIO, 2014).

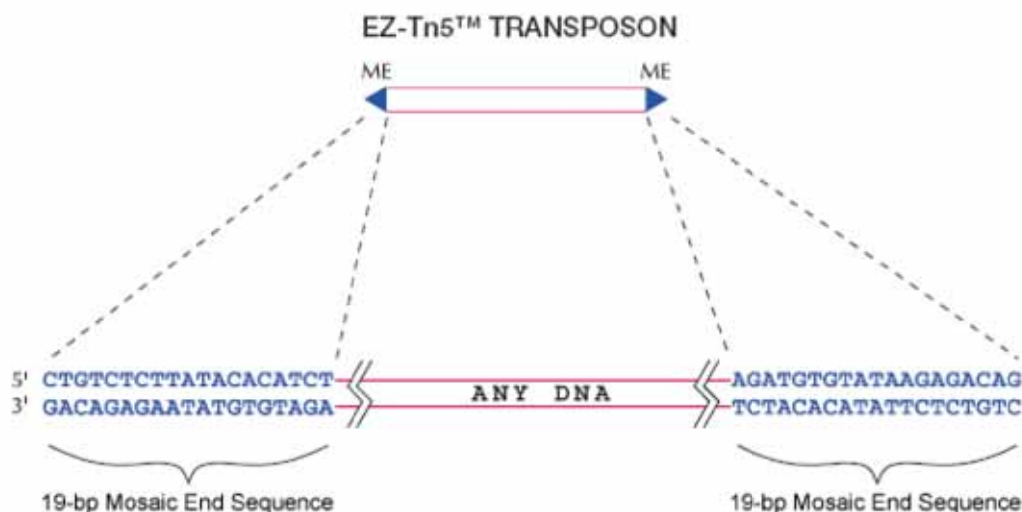


Figura 7. O transposon EZ-Tn5 se insere no genoma de forma aleatória, sendo catalisada pela enzima transposase que reconhece o sítio específico presente nas extremidades do transposon (ME), criando a condição necessária (coesividade de pontas) para que haja a inserção do fragmento no DNA alvo. Fonte: EPIBIO, 2014.

A transposição ocorre de maneira randômica no genoma e a seleção dos mutantes se dá por meio do gene de resistência à canamicina, presente no transposon EZ-Tn5. Logo, haverá a seleção dos mutantes quando semeados em meio de cultura contendo esse antibiótico.

Desta forma, os transposons constituem uma poderosa ferramenta para a identificação de genes essenciais para a viabilidade da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. A disponibilidade do genoma da Xac, e o grande número de genes de função ainda desconhecida, favorece a utilização da técnica de nocaute gênico (“knockout”), através do transposon EZ-Tn5, na tentativa de identificar genes essenciais para patogenicidade e virulência da bactéria

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Células eletrocompetentes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Para a obtenção da biblioteca de mutantes foram preparadas células de Xac eletrocompetentes. Para tal, as bactérias foram recuperadas da preservação, semeadas em meio NA (3 g/L de extrato de carne, 5 g/L de peptona, 15 g/L de ágar) e incubadas a 28 °C por 72 horas. Posteriormente foram replicadas novamente em meio NA e mantida por 24 horas a 28 °C. Com auxílio de alça de platina, uma porção de massa bacteriana foi transferida para um Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio NA líquido acrescido de 10% de glicerol. Esse pré-inóculo foi mantido a 28 °C sob agitação de 200 rpm (agitador Innova 4430, *New Brunswick Scientific*) por aproximadamente 16 horas. Quando a leitura da suspensão atingiu uma DO (Densidade Ótica) de 0,1 a 600 nm, uma alíquota foi transferida para novo frasco contendo 400 mL do mesmo meio de cultura. A multiplicação bacteriana foi medida até atingir uma DO de aproximadamente 0,4 a 600nm. Após esse período, as células foram resfriadas por imersão do frasco em banho de gelo durante 1 hora, seguida de centrifugação à 5.000 x g (centrífuga CR 22 GIII *High Speed Refrigerator Centrifuge*, Hitachi) por 15 minutos a 4 °C. Decorrido este processo, o precipitado foi ressuspenso com igual volume (400 mL) de glicerol 10% sob condições de banho de gelo. Essa etapa foi repetida duas vezes, uma primeira com o mesmo volume e a segunda com ½ volume (200 mL). Após a última centrifugação o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de glicerol a 10%, alíquotas de 50 µL foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e, imediatamente, armazenados em ultra freezer à -80 °C.

3.2 Mutagênese *in vitro*

Foram obtidos clones mutantes por meio de transformação de células de Xac eletrocompetentes utilizando o kit EZ::TN <KAN-2> *Insertion Kit* (Epicentre®), o qual fornece o complexo transposase Tnp e transposon EZ-Tn5 (GORYSHIN et al, 2000).

As células foram eletroporadas com o auxílio do aparelho “Gene Pulser II” (BIO RAD®), utilizando-se cubetas de 0,2 cm, a um pulso elétrico de 2,5 KV, sobre uma capacitância de 25 μ F. Após o pulso elétrico, as células foram recuperadas em 1 mL de meio SOC líquido (1 mL de SOB, 40 μ L de glicose 20%, 40 μ L $MgCl_2$ 1M), por 2,5 horas a 28 °C e agitação de 200 rpm (agitador Innova 4430, *New Brunswick Scientific*). Seguiu-se o plaqueamento das mesmas em meio NA sólido contendo 30 μ g/mL de canamicina e incubadas à 28 °C por 3 dias.

Os mutantes obtidos foram replicados em placas de 96 poços contendo meio de cultura NA líquido acrescido de antibiótico canamicina (30 μ g/mL) contendo 10% de glicerol. As placas foram incubadas por 24 horas a 28 °C, sob agitação constante de 200 rpm (agitador Innova 4430, *New Brunswick Scientific*). As culturas foram estocadas em ultra freezer a -80 °C a fim de compor a biblioteca de mutantes.

3.3 Caracterização patogênica

3.3.1 Testes de patogenicidade

Os 292 isolados mutantes foram multiplicados individualmente em meio de cultura NA sólido, adicionado de canamicina nas condições previamente descritas. Após 72 horas de incubação, cada mutante foi individualmente coletado da placa e a concentração celular padronizada, em água bi-destilada, para uma DO de 0,3 a 600 nm, aproximadamente 10^8 UFC/mL. Após a leitura, a suspensão bacteriana foi diluída a 10^6 UFC/mL.

Com auxílio de uma seringa hipodérmica de 1 mL sem agulha, a suspensão bacteriana diluída de cada isolado foi infiltrada em dois pontos na parte abaxial das folhas, à direita da nervura central, de folhas jovens, totalmente expandidas de lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) uma variedade altamente suscetível, e laranjeira Pêra Rio (*Citrus sinensis*) uma variedade menos suscetível. Ao lado esquerdo da nervura central foram inoculados dois pontos do isolado selvagem como controle positivo da doença.

Para os testes de patogenicidade as plantas inoculadas foram mantidas em um laboratório de segurança concebido especialmente para a manipulação e inoculação de bactérias fitopatogênicas. Este laboratório possui um sistema de filtragem absoluta do ar, um sistema para gerar pressão negativa, impedindo, desta maneira, o escape do organismo fitopatogênico para o meio ambiente, além de manter condições ótimas de temperatura, luminosidade e umidade.

As alterações sintomáticas causadas pelos mutantes foram monitoradas por 30 dias e fotodocumentadas por meio de câmera digital a cada 10 dias. Os mutantes que não apresentaram sintomas foram reinoculados por 3 vezes a fim de confirmar a ausência de lesões da doença nas folhas.

3.3.2 Curva de crescimento bacteriano

Os seis isolados utilizados no teste de patogenicidade (XacM30, XacM51, XacM71, XacM152 e XacM168), assim como a linhagem selvagem (Xac), foram submetidos a novas inoculações em lima ácida 'Galego' e em Pêra Rio, para avaliação do crescimento celular bacteriano no tecido vegetal, após a infecção. As inoculações consistiram de perfuração do limbo foliar com agulhas de 0,55 mm de diâmetro imersas nas suspensões bacterianas. Para cada isolado foram inoculadas cinco folhas, com oito perfurações por folha, sendo quatro de cada lado da nervura central.

Para avaliar o crescimento bacteriano, discos foliares foram retirados das folhas aos 0, 1, 4, 8, 10, 12 e 15 dias após inoculação (DAI). Para tanto, foi utilizado um cortador de folhas de aproximadamente 1 cm de diâmetro e quatro discos foliares contendo o sítio de inoculação foram retirados aleatoriamente (Figura 2 e 3).

Imediatamente, o tecido vegetal foi macerado em 1 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) e plaqueado em meio de cultura NA com auxílio de um plaqueador automático em espiral (Autoplate 4000, Spiral Biotech). Após 72 horas a 28°C procedeu-se a contagem do número de colônias típicas de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

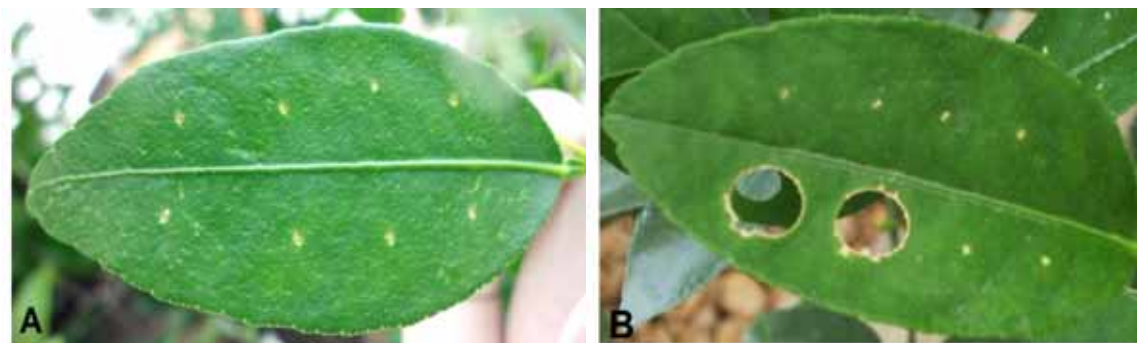


Figura 8. Folha de lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) inoculada com isolados de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, para avaliação do crescimento celular bacteriano após a infecção. Foram feitas quatro perfurações de cada lado da nervura central das folhas (A) e as porções de tecido vegetal circundantes à perfuração foram retiradas em discos de 1cm de diâmetro, a cada dia de avaliação (B).

3.4 Caracterização genética

Para identificar o local de inserção do transposon adotou-se a estratégia de clivar o DNA total de cada isolado mutante de Xac, clona-los no plasmídeo *pBlueScript II SK* (pBS II SK, Stratagene), transforma-los em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* (*E. coli*) linhagem DH10B, selecionar o clone contendo o gene mutado para resistência a canamicina (presente apenas no transposon EZ-Tn5) e realizar o sequenciamento, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para o transposon EZ-Tn5 e para o plasmídeo *pBS II SK*, podendo assim observar toda a região gênica no qual aconteceu a inserção do transposon.

3.4.1 Extração de DNA total de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

A partir dos isolados mutantes que apresentaram alguma sintomatologia alterada, extraiu-se o DNA total utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram quantificadas em *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* e verificou-se a integridade através de gel de agarose a 0,8 %.

3.4.2 Clivagem do DNA e clonagem

Dentre as diversas enzimas de restrição que possuem sítio de restrição único dentro da região de clonagem no plasmídeo *pBS II SK*, selecionaram-se as enzimas *EcoRI*, *SacI* e *SacII* (Fermentas), já que estas enzimas não possuem sítio de restrição no transposon utilizado na geração dos mutantes. Desta forma, dentre os diversos fragmentos de DNA genômico gerados haverá um fragmento contendo o transposon.

A reação de clivagem do DNA total, assim como do vetor, foi realizada com cada enzima separadamente, onde cada reação continha 5 µL de tampão da enzima 10 x, 0,5 µL da enzima de restrição (10 U/ µL), 5 µL (5 µg) do DNA total e 39,5 µL de água bi-destilada estéril. A clivagem do plasmídeo *pBS II SK* se deu com 6 µL do tampão da enzima 10 x, 5 µL de enzima (10 U/µL), 20 µL do vetor (2,5 µg/µL) e 29 µL de água bi-destilada estéril. As reações de clivagem foram incubadas por 16 horas a 37°C. Após esse período as reações foram mantidas a 65°C por 20 min para inativação das enzimas. Para visualização da clivagem foram aplicados 1,25 µg do vetor em gel de agarose a 0,8 % e quantificaram-se os DNAs clivados.

A ligação dos fragmentos no vetor foi efetuada utilizando-se 4 µL do tampão 5 x da enzima ligase, 1 µL do vetor digerido (50 ng/µL), 1 µL do inserto (150 ng/µL), 1 µL de enzima T4 DNA ligase (1 U/µL) e 14 µL de água bi-destilada. A reação de ligação foi mantida a 16°C por 12 horas.

3.4.3 Transformação em *E. coli* linhagem DH10B

Os plasmídeos recombinantes (*pBS II SK* + DNA) foram transformados em células de *E. coli* linhagem DH10B quimiocompetentes. Foram adicionados 5 µL (12,5 ng) do DNA plasmidial a um microtubo de 1,5 mL contendo 50 µL de células quimiocompetentes e manteve-se em gelo durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, um choque térmico foi provocado nas células colocando-se o tubo a temperatura de 42°C por 30 segundos. O tubo foi colocado novamente no gelo por alguns segundos e em seguida o volume total foi transferido para 1mL de meio SOC, mantendo a 37°C, por 1 hora, a 220 rpm (agitador Innova 4430, *New Brunswick*

Scientific). Em seguida, 200 µL dessa cultura foram transferidas para meio 2XTY sólido (contendo por litro 16 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 12 g de ágar, pH 7.4) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 30 µg/mL de canamicina, 0,1 mM de IPTG e 1,6 mg/mL de Xgal e incubado por 16 horas a 37°C. Após esse período, algumas colônias brancas, indicativo da presença do inserto, foram selecionadas para prosseguir com a extração plasmidial.

3.4.4 Extração do DNA plasmidial

Cada colônia recombinante foi transferida para 3 mL de meio de cultura 2XTY contendo 30 µg/mL de canamicina e ampicilina 50 µg/mL e ficou sob agitação de 220 rpm (agitador Innova 4430, *New Brunswick Scientific*), a 37°C por aproximadamente 14 horas. Após esse período de multiplicação das células, a extração do DNA plasmidial foi realizada através do kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel) seguindo as recomendações do fabricante.

3.4.5 Sequenciamento do gene mutado

O DNA plasmidial extraído foi sequenciado utilizando dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, um par específico para o transposon EZ-Tn5, KAN-2 FP1 (5' ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC 3') e KAN-2 RP1 (5' CAATGTAACATCAGAGATTTTGAG- 3') (*Epicentre Technologies*), e um par específico para o vetor pBS II SK, M13 FOW-20 (5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') e M13 REV-24 (5' GGAAACAGCTATGACCATG 3') (*Stratagene*) permitindo assim mapear o local de inserção de cada mutante. Uma vez que o transposon se encontra dentro do gene, empregou-se a estratégia de sequenciar tanto as duas regiões da extremidade de DNA que o flanqueiam, e que direcionam a síntese no sentido externo ao transposon (LAIA, 2007), quanto às extremidades do plasmídeo, que direcionam a síntese no sentido interno ao mesmo, possibilitando assim, o mapeamento de todo o local em que houve a inserção.

A reação de sequenciamento foi constituída de 1,0 µL de *BigDye* (Taq DNA polimerase, dNTPs com e sem fluorescência) v3.1 (*Applied Biosystems*), 3,0 µL de

tampão *SaveMoney* 2,5 x (5 mM MgCl e 200 mM Tris HCl, pH 9,0), 1,0 µL de cada primer KAN-2 (FP-1 e RP-1) a 10 µM/µL, 2,0 µL de DNA a 50 ng e 3,0 µL de água estéril para um volume final de reação de 10 µL. O termociclador PTC-100 *Thermal Cycler* (MJ Research) foi usado com o programa de desnaturação inicial de 96°C por 1 min, seguidos de 39 ciclos de 96°C por 15 seg, 52°C por 15 seg e 60°C por 4 min.

Após a reação, foi feita a preparação do DNA para o sequenciamento, adicionando 80 µL de isopropanol ao produto de PCR. Após 15 min a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich) a 3220 x g por 30 min a 20°C. Após a precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram lavadas duas vezes com 200 µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 10 min a 20°C na centrífuga de placas Rotanta 46R. As amostras foram secas a vácuo e anteriormente ao sequenciamento foi adicionado 10 µL de formamida para desnaturação e manutenção da fita simples. Foi utilizado o sequenciador automático ABI 3730 XL no Crebio (FCAV - UNESP) conforme metodologia sugerida pelo fabricante.

O resultado das sequências foi analisado por bioinformática, a fim de remover possíveis sequências do transposon, e alinhadas com genoma da Xac 306 para identificar o gene mutado. O processo de alinhamento das sequências foi realizado com o auxílio do algoritmo BLASTn e BLASTx (ALTSCHUL et al., 1997).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização genética e patogênica

A inserção aleatória de transposon vem sendo utilizada com sucesso para estudar genomas de vertebrados (MISKEY et al., 2005) assim como de microrganismos patogênicos (SUN et al., 2003; LAIA et al., 2009; VIDAL et al., 2009; ROTT et al 2010; RUIZ et al., 2013) e não-patogênicos (DOGRA et al., 2013; ITO et al., 2014). O sistema de transposição aleatória *in vitro* com o transposon EZ-Tn5 foi descrito por Gorishin e colaboradores (1998) e, por se tratar de um método eficiente e que ocorre de maneira simples, foi aplicado neste estudo.

Para determinar se a inserção do transposon afeta a habilidade de Xac em causar doença, uma biblioteca contendo 8000 mutantes foi produzida. Destes, 292 mutantes foram inoculados individualmente em plantas de lima ácida 'Galego' e laranja Pêra Rio, comparando-se com a linhagem selvagem XAC 306. Dos 292, cinco mutantes foram identificados como tendo patogenicidade alterada no primeiro período de inoculação e demonstraram a mesma ausência de sintomas quando reinoculados em triplicata e repetidos três vezes. As alterações em laranjeira Pêra Rio variaram entre ausência total de sintomas nos mutantes XacM30 e XacM152 (Figura 3) e leve hiperplasia em XacM51, XacM71 e XacM168 (Figura 4). Em lima ácida 'Galego' o que se observou foi a ausência total de sintomas (Figura 5).

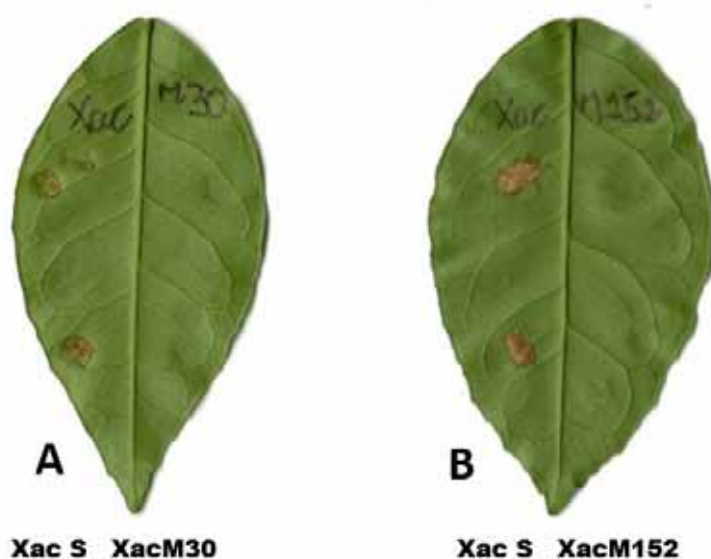


Figura 9. Mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculados em folhas de laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis*) após 30 dias de cultivo. Na porção abaxial ao lado esquerdo da nervura central a estirpe selvagem (isolado 306) e à direita os respectivos mutantes (A) XacM30, (B) XacM152, demonstrando ausência total de sintomas.

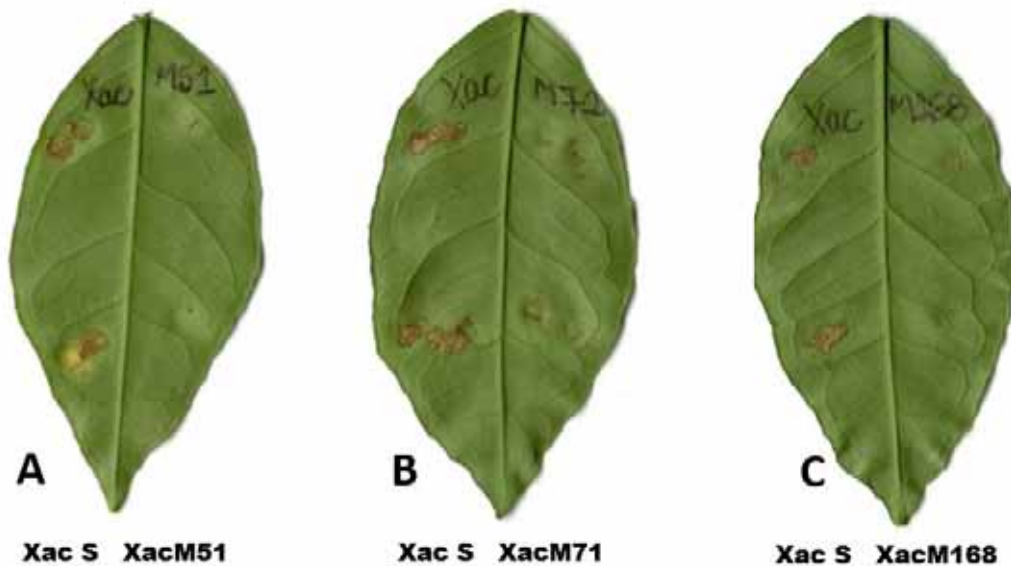


Figura 10. Mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculados em folhas de laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis*) após 30 dias de cultivo. Na porção abaxial ao lado esquerdo da nervura central a estirpe selvagem (isolado 306) e à direita os respectivos mutantes: (A) XacM51, (B) XacM71, (C) XacM168 demonstrando leve hiperplasia dos tecidos.

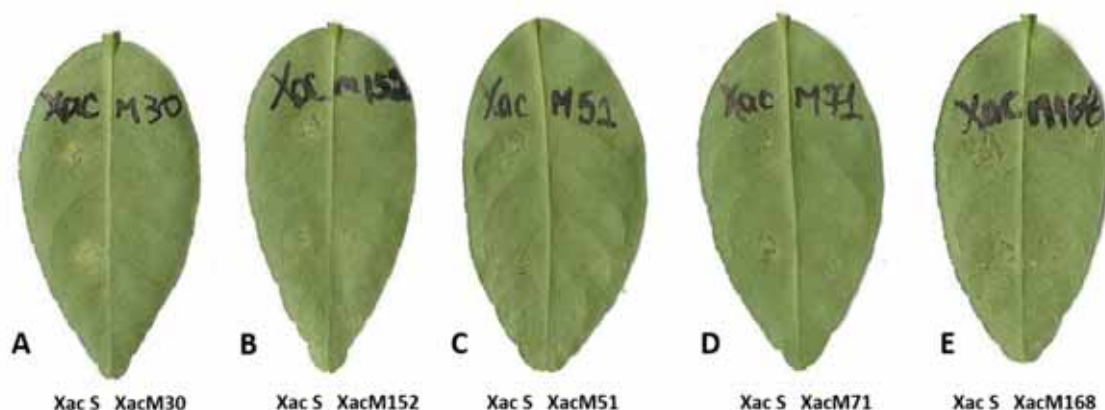


Figura 11. Mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* inoculados em folhas de lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*) após 30 dias de cultivo. Na porção abaxial ao lado esquerdo da nervura central a estirpe selvagem (isolado 306) e à direita os respectivos mutantes (A) XacM30, (B) XacM152, (C) XacM51, (D) XacM71 e (E) XacM168, demonstrando ausência total de sintomas.

Após as análises de sequenciamento da região gênica mutada pôde-se verificar que o mutante XacM30 teve a inserção do transposon na ORF XAC1032 (Figura 6) após a base 1.190.836 (Figura 7), o qual representa o gene *purF*. Esse gene codifica uma proteína com similaridade a amidofosforibosiltransferase muito conservada no gênero *Xanthomonas* (GUO et al., 2012). A inserção resultou na interrupção do códon do aminoácido Valina, levando ao truncamento dessa proteína (Figura 8). O domínio da proteína no qual ocorreu a inserção foi o Fosforibosil Transferase (Figura 9).



Figura 12. Localização da ORF XAC1032 no genoma da Xac. A ORF está localizada na fita senso do DNA genômico, compreendendo as bases 1189902 a 1191368.

1189902ATGTGTGGCATCGTCGGTATTGTCGGCAACCAGAACGTCGCCGGGCAGCTGTATGACGGCC
TGACCGTCCTGCAGCATCGTGCGCAGGACGCCGAGGCATCGCCACCGCAGATGGCACGCGCCTGCGC
GTGCAGAAGGCCAACGGCCTGGTGCGCGACGTCCTTCGACGAAAAGAAGATGGCGGTGCTGGAAGGCCG
CGTCGGCATCGCGCATTGCCGCTACCCGACCGCAGGTTTCGGAAGGCATGGACGAGGCGCAGCCGTTCT
ACGTCAACTCGCCCTACGGCATCGCGCTGGCGCACAACGGCAACCTGATCAACACCGAGGCCTTGCGC

CAACAGGTGTTCTGAAGCCGACCGCCGCAATATCAATACCGATTTCGGACAGCGAAGTGCTGTTGAACGT
 GTTCGCCTACGAGCTGGACGCGCAGCGCATGCTTACCCCCGAAGCGGCGATCCGCGCGGTGGCCGGCG
 TGCACCGCCGTTGCAAGGGCGGCTACGCGGTGGTCAGCGTGGTGCTGGGCCTGGGCCTGGTGGCGTTC
 CGCGATCCGCACGGCATCCGCCCGCTGGTGCTGGGCAAGCGCGAGCATGCCGAAGGCACCGAATACAT
 CGTGTCCTCCGAATCGGCAGCGCTGGATATCCTCGGCTACCAGCGCGTGCGCGACGTGCGCCCCGGCG
 AAGCGCTGGTGATACCGCGCGCGGCGAACTGTTCTCGGAAGTCTGCGCGGCACCGACCAACAACGCG
 CCGTGCAATTTTCGAGTACGTGTATTTTCGCGCGCCCCGATTTCGATGATCGACAACATCTCGGTGCACAA
 GGCGCGCATGCGCATGGGCCTGAAGCTGGGCGAAAAGATCCTGCGCCTGCGCCCGGACCATGACATCG
 ACACCATCATTCGATCCCGGACACCTCGCGCGATGTGGCGTTGGAGATGTCCAACGT▽1190836GC
 TCGGCGTGAAGTACCGCGAGGGCTTCGTCAAGAATCGCTACGTGGGCCGCACCTTCATCATGCCGGGG
 CAGGGCGAACGGCAGAAATCGGTACGTGCAAGCTCAATCCGATCCATCTGGAATTTTCGTAACCGCGT
 GGTGCTGCTGGTGGACGATTCCATCGTGCGCGGCACCACCAGCCGGCAGATCGTGACAGATGGCGCGCG
 ATGCCGGTGCGCGCAAGGTGTACCTGGCCTCCGCCGCGCCCGCGGTGCGCTACCCCAACATCTACGGC
 ATCGACATGCCGGCCGCCGAAGAGCTCATCGCGCATGGCCGCGAGCGAGCTGGAAATCCAGGAGTTCTT
 GGGCTGCGACTGGCTGATCTACCAGGATCTGGAAGACCTGGAAGTGGCGGTGCGCGAAGGTAATCCGG
 ACATCAAGCAGTTTCGATTCTTCGTGCTTCAACGGCGAGTACATCACCGGTATCGAACCGGGGTATTTT
 GAACGCATCCAGCAGCTGCGCTCGGACGATGCCAAGAAGCGTCGCCGCGCCATGA1191368

Figura 7. Sequência de nucleotídeos da ORF XAC1032 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 1.190.836, como indicado na sequência por um triângulo vermelho invertido. O códon GT▽G interrompido após a segunda base codifica o aminoácido Valina (V). **ATG**: códon de iniciação de leitura; **TGA**: códon de terminação.

1 MCGIVGIVGNQNVAGQLYDGLTVLQHRGQDAAGIATADGTRLRVQKANGLVRDVFDEKKM
 61 AVLEGRVGIACRYPTAGSEGMDEAQPFYVNSPYGIALAHNGNLINTEALRQQVFADRR
 121 NINTDSDSEVLLNVFAYELDAQRMILTPEAAIRAVAGVHRRCKGGYAVVSVVLGLGLVAFR
 181 DPHGIRPLVLGKREHAEGTEYIVSSESAALDILGYQVRDVRPGEALVITARGETLFSEVC
 241 AAPTNNAPCIFEYVYFARPDMSIDNISVHKARMRMGLKLGEKILRLRPDHDIDITIIPIPD
 301 TSRDVALEMSN▽VLGVKYREGFVKNRYVGRFTIMPGQGERQKSVRRKLNPIHLEFRNRV
 361 LLVDDSIVRGTTSRQIVQMARDAGARKVYLASAAPPVRYPNYIDMPAAEELIAHGRSE
 421 LEIQEFLGCDWLIYQDLEDLEVAVREGNPDIKQFDSSCFNGEYITGIEPGYFERIQQLRS
 481 DDAKKRRRA 489

Figura 8. Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC1032 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção do transposon após a Asparagina (N) da posição 301, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido, interrompeu o códon do aminoácido Valina (V) 302, levando ao truncamento da proteína.

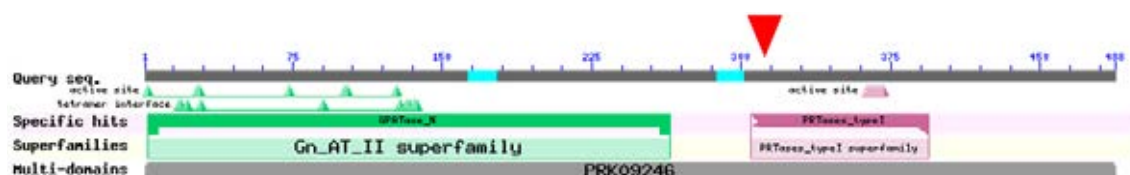


Figura 9. Domínios da proteína e local da inserção do transposon. A inserção do transposon ocorreu na porção N-terminal do domínio Fosforibosil Transferase, como indicado pelo triângulo vermelho invertido.

Quanto ao teste de patogenicidade, 30 dias após a inoculação do mutante XacM30 em folhas de laranjeira Pêra Rio, verificou-se ausência total de sintomas de doença, indicando que o gene *purF* poderia estar relacionado à patogenicidade de Xac. Da mesma forma Guo e colaboradores (2012), através de uma biblioteca de mutantes de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc), relataram que o gene *purF*, dentre outros, possivelmente estaria envolvido com a patogenicidade durante a interação Xoc e arroz. Entretanto, no presente trabalho, após as análises da curva de crescimento bacteriano do mutante XacM30 (Figura 10), constatou-se que a bactéria com o gene *purF* mutado se multiplicou em concentrações não significativas quando comparado com a linhagem selvagem XAC 306, deixando de estabelecer uma relação patógeno-hospedeiro.

Trabalhos anteriores (SHIMAOKA et al., 2007; QIAN et al., 2005) já relataram que a patogenicidade reduzida em plantas hospedeiras a partir da bactéria contendo o gene *purF* mutado, deve estar relacionado a incapacidade do fitopatógeno se multiplicar e conseqüentemente, não sobreviver no meio em que se encontra. Portanto a mutação no gene *purF* torna o organismo auxotrófico e a proteína amidofosforibosiltransferase é primordial para seu metabolismo basal de crescimento celular, pois é uma enzima limitante da via de síntese “de novo” de purinas (YAMAOKA et al., 2001). Tal efeito contribui para o entendimento do resultado obtido no presente trabalho, sugerindo que a mutação nesse gene afeta diretamente a sobrevivência do fitopatógeno na planta, mas não interfere diretamente na virulência da bactéria.

A incapacidade de um organismo em causar doença pode ser decorrente da falta de enzimas do metabolismo básico, cuja expressão independe da interação com o hospedeiro, ou da falta de enzimas diretamente relacionadas à interação planta-patógeno, as quais somente são necessárias quando o patógeno está se multiplicando no seu hospedeiro (WULLF, 2003; BUTTNER, BONAS, 2010). Dessa forma, justifica-se neste trabalho, que a bactéria não conseguia se multiplicar por faltar fontes nutricionais para seu metabolismo de crescimento celular e logo, não expressou sintomas da doença. Estes dados corroboram com Laia (2007), que visando identificar genes de Xac relacionados ao processo de infecção em citros, demonstrou que o gene *purF* apresentou perfil de expressão reprimido quando a

bactéria Xac foi cultivada em meio de cultura XAM1, indutor de patogenidade. Caso contrário, ou seja, se esse gene estivesse associado à patogenidade, deveria ter sua expressão induzida quando em contato com o meio XAM1 que mimetiza os espaços apoplásticos da planta hospedeira.

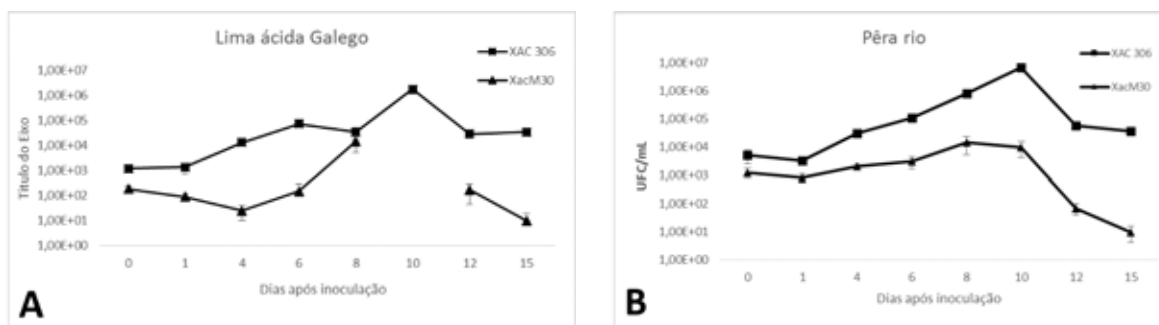
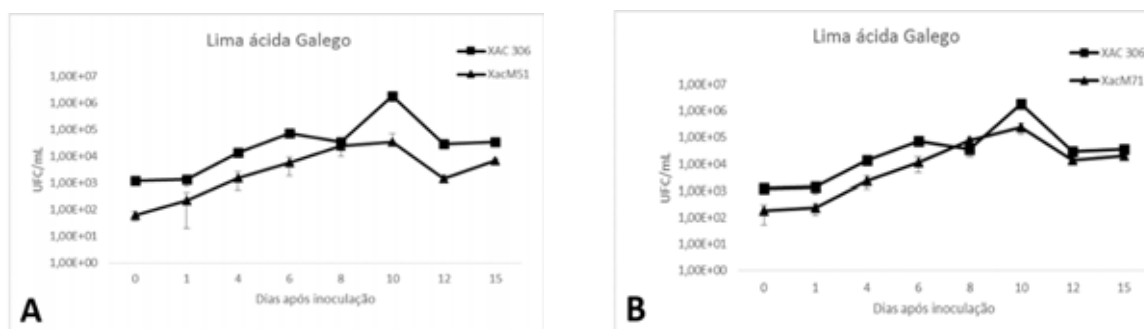


Figura 10. Curva de crescimento bacteriano do mutante XacM30, de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, inoculado em folhas de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*) (A) e laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis*) (B), por período de 13 dias, demonstrando baixa multiplicação das células do mutante a partir do primeiro dia após inoculação.

Ao analisar as curvas de crescimento bacteriano dos demais mutantes obtidos de Xac, XacM152, XacM51, XacM71 e XacM168, foi possível verificar que todos tiveram o crescimento (multiplicação celular) normal durante todo o período de avaliação *in planta* (0, 1, 4, 6, 8, 10, 12 e 15 DAI). Isto indica que as mutações nos referidos genes não prejudicaram a sobrevivência do fitopatógeno nas plantas hospedeiras (Figura 11 e 12).



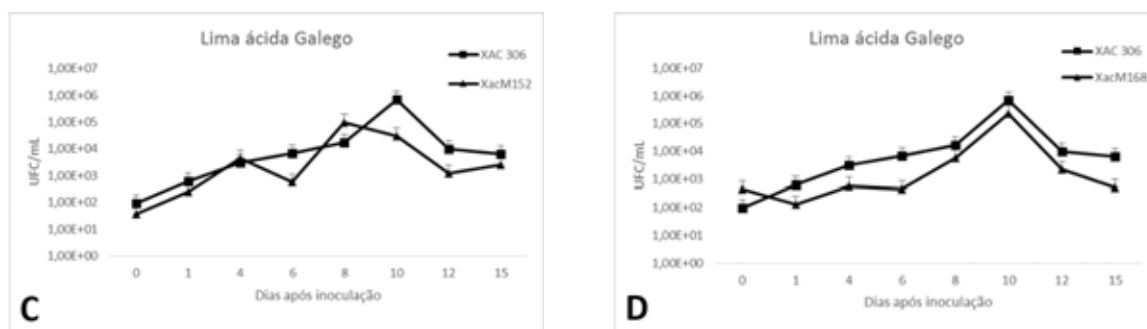


Figura 11. Curva de crescimento bacteriano de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306, e dos mutantes (A) XacM51, (B) XacM71, (C) XacM152 e (D) XacM168. A curva de crescimento foi avaliada ao longo de 13 dias após a inoculação em folhas de lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifoli*).

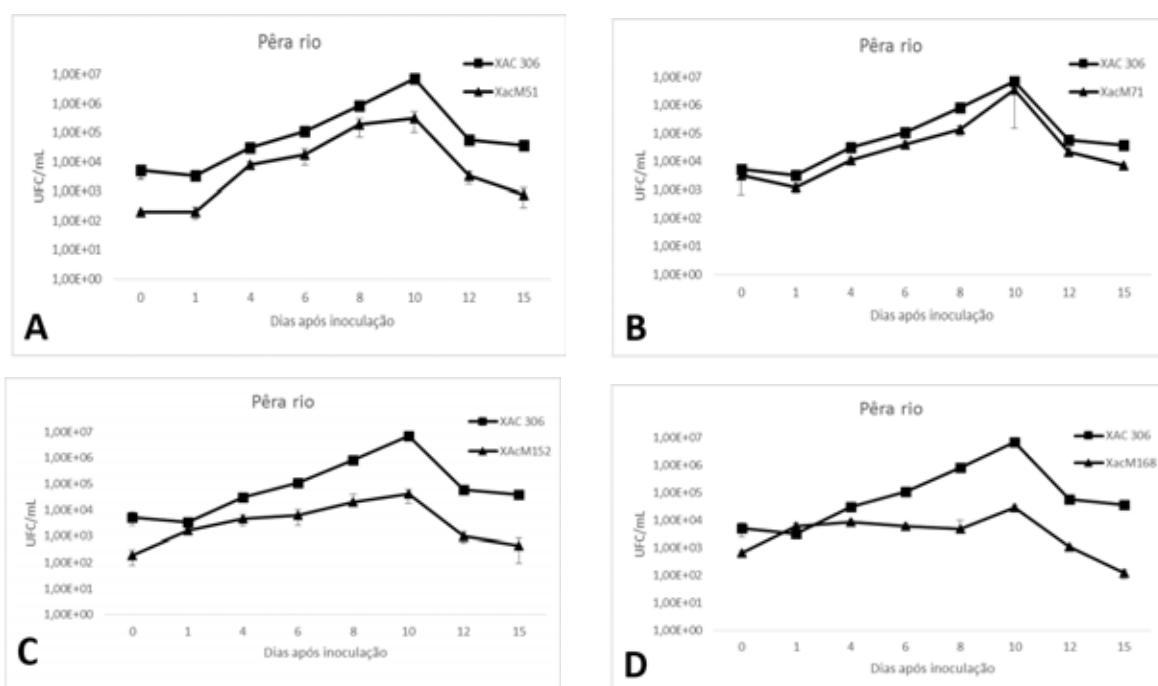


Figura 12. Curva de crescimento bacteriano de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306, e dos mutantes (A) XacM51, (B) XacM71, (C) XacM152 e (D) XacM168. A curva de crescimento foi avaliada ao longo de 13 dias após a inoculação em folhas de laranja Pêra Rio (*Citrus sinensis*).

A inserção do transposon para o mutante XacM152 ocorreu na ORF XAC4113 (Figura 13) após a base 4819965 (Figura 14) interrompendo o gene *yapH*, que codifica a proteína *yapH* relacionada à adesividade da bactéria na superfície celular hospedeira. Quando inserido, o transposon levou ao truncamento da

proteína, interrompendo-a na posição 2334 logo após uma Alanina (Figura 15). Essa proteína possui um domínio ades de atividade de hemaglutinação na extremidade aminoterminal e, dois domínios FhaB encontrados em exoproteínas de grande tamanho envolvidas na utilização do grupo heme ou na adesão: um na porção aminoterminal e outro na porção carboxiterminal. A inserção do transposon EZ-Tn5 ocorreu na porção carboxiterminal da proteína, logo após o domínio FhaB (Figura 16).



Figura 13. Localização da ORF XAC4113 no genoma da Xac. A ORF está localizada na fita antisenso do DNA genômico, compreendendo as bases 4819965 a 4826966.

4826966ATG GCGCATCAGCGCCGCGCTTCCGACCGGCGCGCGCAATGCCTCCGACGGACGCGACGAC
 GCGCGCATCTACACGCGTTTCGGCTTCACTTTTTGAGGGATCTGCGCATGCACGCCACCATCCATCCC
 GCGACCTCGCCGCGCACGCTCCCGTTGCGTCATCGCCGCTGGCCCTCGCGCTGGCAGCTGCGCTGAT
 GGCCATGCCGGTCAGCGGCCCTGGCCAGGTGGCGGCCAACCAGCTGCCACCGGCGGCAGCATCGTCG
 GCGGCACCGGCACCATCAACGCTGCCAGCGGCACGACCCGGGTTGTGACAGACCTCCTCGCGCATG
 GCGCTGACCTGGTCGGCGTTCGACATCGGCTCGGCCGCGACGATGACCTTCAACCAGCCAACGACCAC
 CTCGGTGGTCTCAACCTGGTGCAGGGGGCAACCCACACAGATCTTCGGCAACCTCACTGCCAACG
 GGCAGGTGTTCTGCTCAACAGCAACGGCGTGCTGCTCGGAAGCACCGCCAACATCAATGTCGGTGGC
 CTGGTGGTCAGTACGCTGGGCACCAGCGTGTCCCAGTTCATGAACGGCAACTACGTCTTCGACGCCGG
 CGGCAATACCGTGGCGCTGGTCTCCAACAGCGGCACCATCAATGCGGCGGCCGGGTGGGCCACGCTGA
 TCGGCGGCCGGGTGCGCAACAGCGGCACCATCACCGCCACCGCCGGCAACATCACCTCGCCGGTGCC
 GACGCAGCCACGCTGACGTTTCAAAGCGGCGGCTTCGGCGTGCTGATCGACAAGCCGCTGCAGCTGAG
 TCTGGCCACCGAGGCGGTGGACAATTCCGGCACCTTGAGCGCGCCAGGCGGCGGATCCAGCTGCAGG
 CGCGCGCGGCGCAAGGCATCTTCGATCGACTCATCAACAACAGCGGCACCATTCGTGCGTCTGCTGCTG
 TCCACTGGTCCCGACGGCAGCGTGTGCTGATCGCCTCCGGCGCTGGCAGCTTCGATGTCGCCGGCGG
 CGGCAGCATCGATGCCGGCACCGGGGCCATCACCTGGGCACCGGCCGCGGCGTACAGCAGACCGGCA
 TCTACACCGCCGGCAGCCTGGGTGGCTTTATCGGTGGCAGTGCCACCTTCAGCGGGGCCAACAAGATC
 GGCGGCCCTCGGCAACCTGGACGTAGGCGGCACCTCAGCCTGACCAACACGGTCGCGTTGTCCCAATC
 CGGTTGCTGCGGTGACGGGCACCAGCCAGTTCCTGCAGTCCGGCAGTGCGCTTTGCTTGACCAACG
 GCGGCAATACCTTCGGTGGCCTGTTGAGCGCCAGCGGCAACGGCATTGCCGTGAACGCGGCAGGCAAT
 CTCTCGATCGGCACGTTGAACCTCGATAGCAACAGCGCGCTGTCGTTGAGCGCCAGTGGCGCTTTGAC
 CTTGCCGACAACGGCGATCAACACCGGCAGCGCCAACCTCACCTGGCCAGCGGCGGTGGCCTCACCA
 CGCGCGCTGCGTTGGCCGGGAGGAACGTGGACCTCACCGGTCGCGGCGGCATCGCGCTGGCGCACGAC
 GTCAGTGCAGCCGGCACGCTGAAATTGACCGCCACCAATGCTGCGATCACGCAAACCGCCGGCAGCGT
 GGCCGCCACCGGCACCAGCACCATCAATGCCGGAACCGGCGCCATCACGCTGGACGGTGCGAGCAACG
 ACTTCCAGGGTGCGGTGGCGCTGACCGGCGGCAACACACGCATCAGCGACAGCGGCGCGCTGACCTTG
 GGTACGGTGAACAGCAACGATCTCACCGCCACCAGCAACGGCGCGTGAACCTGGGCAGCGGCCGGGT
 GGGCGGCGCGTGTCTGCCACCAGCAACAACGGCGCGATCACGCAGTCGGGAACCGATGGCTTGACCA
 TCGTCGGCACCGACCTCACGGCCGGCACCGGTGCGATCACGCTGAACAACAGTGGCAATACCTTT
 GGCGATCTGGTCAGCGCGACCGGGCGCGGTATCTCGTTGAACGCTGCCGGCACTCTGTGATCGGCAC

CTTGAGCCTTGGCAACAACAGCGCACTGTCGCTGCGTGCCACCGGTGCATTGACCCTGCCGGCAGCGG
 CGATCAACACCGGCAGCGCCAACCTCACCTGTCCAGCGGCGGCAGCCTCACCACGCGCGCCGCGTTG
 GCCGGCACGAACGTGGACCTCACCGGCACTGCCGGCATGACTCTGGGGCATGACGTACTGCAAGCGG
 CACGCTGGCACTGACCACGACCGACAGCGCAATCACCCAGACCGGGCGGCAGCGTGACCGCCACCGGCA
 CCAGCACTATCAGTACCGGAACCGGCGTCATCGAACTGGACGAAGCGACCAACGATTTTCAGGGTGTG
 GTGACGCTGACCGGAGGCGACACCCGCATCGCCGACACTGGCGCGCTGACGCTGGGTGCGCTGAATAC
 CGGCAACCTCATCGCCACGAGCAACGGTGCCTTGAACCTGGGCAGCGGCAGCGTTTCGCGGCACGCTTG
 CTGCGAGCAGTGGCAATGGCGCCATCGGCCAGGCCGGCGGACTGATCGTCGATGCTACCGCCACCCTC
 AACGCCGGCAGCGGCGCCATTGCGCTGACCGATGGCAGCAACGATTTCCGTAGTGGCGTCAGCCTGAC
 CGGCACCGGCATCGGCGTGGTCGATCGTGACGATCTGCGCGTCTCCTCGATCAGCAACGGCACCAATG
 GCGCCATCGCCCTGACCGCTGGTGGCGCACTCACGCTGCCACGCAAAACCTCAGCACCGGCACTGGC
 GCGCTCAGCCTGATCGCCAATGGCGGTGCATTGAGCACGAATGGCAGTTTGAAGCGGTGGCAACGTGAG
 CCTGAGCGCGCGCGATGGCGTGGTGTCAATCACACGTCACCGCCGGCGGCATCCTGGGCTTGACTG
 CCACCAACGCCGCGATCACCCAGAATGCGGGCGTGCTCGACGTGCGCGGTCTGGCCACCGTCGATGCC
 GGCAACGGCGCCATTTTCGCTGACAGGCGATAACGATTTCAAGAACGGCATTGCACTGACCGGTGCGAA
 TATCGCCGTGGTCGATGCGAACGACCTCAGCGTGGTCTCGCTCACCAACGGTGGTGCCGGCACCATCG
 CGCTCACCGCAGGCAACTCGCTCACGCTGCCTGGCAGCGGATTGACCAGCAGCGATGACCTGACGCTG
 CGCGCAGACAACGGCACGCTGACACTGGGCGGCGATCTCGTCGGCAATGCGGTCTCGCTGTTTACGCGC
 CAACGCACTGACGCTGGCGACCGGCATCGCCAGCAGCACGTTGTGCGGTGTCCACCAGCAACGGCGCGA
 TCAACCAGACCGCAGGCGCCTTGCGTATCGGTTTCGACCTCCAGCGTCAACGCCGGCTCCGGCGCGATC
 GCGTTGGGCAGCGCCGTAATCAGTTTCGGCGGCGCAGTGAGCCTGACCGGCAACGGCGTGTGATCCG
 CGACAGCGGCGCCTTGACGCTGGGCACGCTGAACACCGGCAGCCTCACCGCCACCAGCAACGGCGCAT
 TGAGCCTGGGTAGCGGTGCGGTTGCCGGCACGCTTGCTGCGAGCAGCGGCAATGGCGCCATCGGCCAG
 GCCGGCGGACTGATCGTCGATGCTGCCGCCACCCTCAATGCCGGCAGCGGCGCCATCACGCTGACCGA
 TGGCAGCAACGATTTCCAGGGCGCCATGCGCCTGACCGGTGCCGGCATCGCGGTGCGCGACAGCAACG
 ATCTCACGTTCTCGGCGTTGACCAGCAACAACGGCGGCACGATCGCGCTGACCGCGGGCGGCAATCTG
 GCCCTGCCAGGCACGACGTTGAACAACGGCAGCGGCAACATCGATCTGATCGCCAACCACCTGAGCCT
 GTCGGCAGCGTTGCTTGGCGACGAAGTGAGCCTGCGCGCCAACAGCGGCTTGACCTTGGGCCAGACCA
 TCACCGCGCGCACATTGTGCTTGAAGCAGCAATGCCGCGATTACGCAAAGCGGCGGCGCACTGCTG
 GTCAGCGGCGCCACCACGGTCGATGCAGGCACGGGTGCGATTTCGTTGCTGCAAGCCGGCAATAACTT
 CGACAGCGTGCGCCTGATCGGCAACGGCATTTGGCGTGACCGACGGCGACAACCTCAGCCTCGCCGCAC
 TGACCAGCACCGGCAATGGCGCGGTGCTCGTGACGGCCGGTGGTACCTTGAGCCTGCCGTGCGAGGCT
 ATCGCGGTGCGGCAACAGCAACCTGACCCTGTATCGAACGGCGGCGCACTGAGCACGGCCGAGACCT
 GGGTGGCAACGACGTGACGCTGTTTCGGACGCGACGGCCTGACGCTCGGCCACACCGTCACCTGCCAACA
 CGCTCGCCCTGCGCAGCACCAATGCCGCCATCGCGCAGAACGCCGGCGCACTCGCCATGGTGGGTGCC
 AGCACCGTCGATGCCGGTAGCGCCAGCATCGCGCTCAACGGTGGCAGCAACCGCTTTGGCGCTGGCAT
 CAGTCTCACCGGCACCGGCATCGCAGTGGCCGATAGCGGCAACCTCACCATCAATGCCTTGAATGCCG
 GCGCCAACGGCACCATCGCGTTGACCGCCGGCGGCGCACTGAATCTGTCCGCGCAGAACCTGGACACC
 GGTACCGCCGATCTTGCCCTGATCGCCAACGGCGGCAGCATGAGCACCGGCGGCGACTTACGCGGCCG
 TAACGTGACCCTGTCCGCACGCGACGGTCTACCATCGGCCACGCCATCACCAACCACCGACGCGCTAT
 CGCTGAGCAGCAACAACACCGCGATCACGCAGACCGCCGCGGCACTCAACGTTGGCACCACCACCAC
 GTTAATGCAGGCAGTGGCGACGTACGCTCAACATCGCGGGCAACACCTTCGACGGCGTGGTCAATCT
 CACGGCAGGCGATGTGCAGATCGCCGGCAACGCACTCGGTTTCGGCACGCTGTCCACCAATGCACTCA
 CCGCCAACAGCAGTGGCGCATTTGAATCTCGGTGCGGGTGTGGTGGTGGCGGCTTGAACGGCACACG
 GGCAATGCAGCGATCACCCAGAGCGGCGGGTTGTGCGGTGCGCGGTGCATCCACGTTGAATGCCGGCAG
 CGGCGACATCGCCTTGACCGATGCCAACAACGACTTCGTCGGCGCGGTTGCGCTCACCGGCAATGCCA
 TCGCCGTGCAAGATCGCAACGACCTCAGCATCGCTGCGGTGCGCAGCGGTGCCAACCGCGCGATCGCG
 CTGGTTCGCGGGCGGTGACTTGAACCTGCCGGCCAGCCAGATCGACGCCGGCACCGGCGCGCTGACGCT
 GACAGCCAACGGCGGCACCTTGCACACTGCCGGCGCGTTGCGCGGTGGCACGGTGCATTTGACCGGCG
 CCAGCGGCATCGCGCTGAGCAACACGGTCACGGCAAGCAACGCGCTGCGCTTGAACAGCAACAACGCC
 GCCATCACCCAGACCGGCGGCGCATTGCTGGTCGAGGCGACACCGCGGTGATGCCGGCGGCGGCGC
 CATTGCCCTGGAGGCGGCGGCAACGACTTCCAGGGCGTGCTCGCCCTGACCGGCGGTGCAAGCAGCG
 TGCGCGATGCCAATGCCTTGACCCTGGGCACGCTCAACACCGGCGACCTGCAGGTCCGCAACAGCGGT

GCGCTGAATCTGGGCGTTGGCCTGGTCAATGGCGATCTGGATGCGGCCAGCAACGGCGGGCGCCGTAC
 CCAGAGCGGTGCCGTGACCGTTACCGGCAGCGCCCGCATCGATAGCGGTGGCGCCGCCATTGCATTGA
 CCGATGCCGGCAACGATTTCCAGGCGGCGGTGAGCCTGAGCGGCGGCACGGCCAGCGTGCGCGATCGC
 AATGCGCTGGTCTTGGGCAACCTGGATGTCGATGCACTGGAGGTGCGCAGCGGCGCCGGCCTGGATCT
 GGGCCGGGGGCGGATCGGCGGTGCGCTGGTGGCACGCGAGCGGGAGTGCAGCAACGGCCAACGCCAGCA
 CGGTCTTTGCCAGGCGATCGCCGTGCTGCGGCCACCGCTGCCGGCATCGCCCAGCAAGGCGCATTG
 ACGGTGGTTCGGCAGCAGCCTGCTCGATGCCGGCACCGGCGCGATCGTGCTGGATGCGGCCGATAACGA
 CTTCAGGGCACGGTGCAGGCGCGCGGCAGCAGCATCGCCCTTGTCGATCGCAACGACCTGGCGGCGA
 CTGCGCAAGCCAGCGATGCCCTGCGTCTGCGAGCCGGTGGTCAGCTCGCTACCGCCGGCATGCTCAGC
 GCCAACGCCATCGCCCTGCGCGGCGGCACCGGCGTGGTCTCGGTACGACATTGGAGGCGCCAGCGT
 GGCTTTGAGCAGCGGCGGGGCGATCACCCAGGACGCCGGCAACCTGCGCGCCGGTCAGCTCAGCGGCA
 GCGCCGCCGGGGCGGTGCGGCTCACCGGCAGCGGCAACGCCATCGATGTGCTCGGTGACTTCAGCGCG
 CAGGGCCTGGATGTGCTCAGCAACCGCACATTGCTGGTCAGCGGCCGCGTCGCGGCGGCCCCCTCGCT
 GCGCCTGCGCAGCGGCGGCGAATTGCAGCTGAGCGGCCAGCTCGGCGGTGCCACCAGCTGGTTGCAGG
 CTGTGCGCCGGCATCGGCCAGCGCGCCGGCAGTTTCGATCACCGCCGGCCTGCTCAGCGGTAGCGCAGGC
 GGGCCAGTGGCGCTGGGCGATGCGGCCGGCTTCATCGATAACCGTGTCTGACGCCTGGGCGACTTCGT
 CGCCAGCAACGGCTTCAGCTTCACCAACGGCGGCGACCTGCTGCTGGTGCTGGCCAATGGCAGCAGCT
 ACAGCGTGGATGCCGGCAACAGCGCGATGTTCTGTGGTACGCGGCAATCTGTTCCAGGACGGCCGC
 GCGCCGTTGCGCAACGGCACCGGCACCTTTGCCGCCACCGGCCAGATCGGTACGCAGCAGAACCCGAT
 CTATGTAACCGGCACCGGCACCCAGACCGTGGCGGCGATCGGCGCGCCGCCGGCGGTATTTCAACGCCA
 CGGCG▼4819965GTTCGATGGCAGCCTGCTCGATCTGGCCGGCGCCTCCGGCTTCAATGTGCCGGCCT
 CGGCGTTTTCGGGGCCGTGCGCAGAGTTTCGGCCAGCCGCACCGTGGCCTTCGTGGACCTGTGCGCCGGC
 GGTACCCCGTACCGCGCCTTCGGCCTGGTCCGCCCGGCCCTGCGTCTGCCCAGCAGACCAGCAGCCGGC
 CTGCGATGCCGGCGATCCGGACGCAGTCTGCAGCCCCAAGTGA4819731

Figura 14. Sequência de nucleotídeos da ORF XAC4113 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 4819965, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido. A inserção ocorreu logo após o códon GCG que codifica o aminoácido Alanina. **ATG**: códon de iniciação de leitura; **TGA**: códon de terminação.

1 MAHQRRASDRRAQCLRRTRRRPHLHAFRLHFLRDLRMHATIH PATSPRTLPLRHRPLALA
 61 LAAALMAMPVSGLAQVAANQLPTGGSIVGGTGTINAASGTTRVVDQTSSRMALTWSAFDI
 121 GSAATMTFNQPTTTSVVLNLVQGGNPTQIFGNLTANGQVFLNLSNGVLLGSTANINVGGL
 181 VVSTLGTSVSVQFMNGNYVFDAGGNTVALVSNSGTINAAAGSATLIGGRVANS GTITATAG
 241 NITLAGADAATLTFESGGFGVLIDKPLQLSLATEAVDNSGTL SAPGGAIQLQARAAQGI F
 301 DRLINNSGTIRASSLSTGPDGSVSLIASGAGSFDVAGGGSIDAGTGAITLGTGRGVQQTG
 361 IYTAGSLGGFIGGSATFSGANKIGGLGNLDVGGNLSLTNTVALS QSGSLAVTGT SQFLQS
 421 GSALSLTNGGNTFGGLLSASNGIAVNAAGNLSIGTLNLD SNSALSLSASGALTLP TTAI
 481 NTGSANLTLASGGGLTTRAALAGRNVDLTGRGGIALAHDVTATGTLKLTATNAAITQTAG
 541 SVAATGTSTINAGTGAITLDGASNDFQGAVALTGGNTRISDSGALT LGTVNSNDLTATSN
 601 GALNLGSGRVGGALLATSNNGAI TQSGTDGLTIVGTSDLTAGTGAITLNNSGNTFGDLVS
 661 ATGRGISLNAAGTLSIGTSLGNNSALSRLATGALTLPAAAI NTGSANLTLSSGGSLTTR
 721 AALAGTNVDLTGTAGMTLGHDTVASGTLALTTTDSAITQTGGSVTATGTSTISTGTGVIE
 781 LDEATNDFQGVVTLTG DTRIADTGALT LGALNTGNLIATSNGALNLGSGSVRGTLAASS
 841 GNGAIGQAGGLIVDATATLNAGSGAIALTDGSNDFRSGVSLTGTGIGVVD RDDL RVSSIS
 901 NGTNGAIALTAGGALTLP TQNLSTGTGALS LIANGGALSTNGSLSGGNVSL SARDGVVLN
 961 HNVTAGGILGLTATNAAITQ NAGVLDVGG LATVDAGNGAISLTGDND FKNGIALTGRNIA
 1021 VVDANDLSVVSLTNGGAGTIALTAGNSLTLP GSGLTSSDDLTLRADNGTLTLGGDLVGNA
 1081 VSLFSANALTATGIASSTLSVSTSN GAINQTAGALRIGSTSSVNAGSGAIALGSAGNQF

```

1141 GGA VSLTGN GVSIRD SGALT LGLT LNTGSL TATSN GALS LGS GRVAGT LAASSGNGAIGQA
1201 GGLIVDAAATLNAGSGAITLT DGSNDFQ GAMLRTGAGIAVRDSNDLTF SALT SNNGGTIA
1261 LTAGGNLALPGTTLNNGSGNIDLIANHL SLSAALLGDEVSLRANSGLT LGQTITARTLSL
1321 ASSNAAITQSGGALLVSGATTVDAGTGAISLLQAGNNFDSVRLIGNIGIGVTDGDNLSLAA
1381 LTSTGN GAVVVTAGG TSLPSQAI AVGNSNLT LSSNGGALSTAADLGNDVTLFGRDGLT
1441 LGHTVTANTLALRSTNAAIAQNAGALAMVGASTVDAGSASIALNGGSRNFGAGISLTGTG
1501 IAVADSGNLTINALNAGANGTIALTAGGALNLSAQNLDTGTADLALIANGGSMSTGGDLR
1561 GRNVTLSARDGLTIGHAITTTDALSLSSNNTAITQTAAALNVGTTTTVNAGSGDVTLNIA
1621 GNTFDGVVNLTAGDVQIAGNALGFGLTSTNALTANSSGALNLGRGVVRGALNGTSGNAAI
1681 TQSGGLSVGGASTLNAGSGDIALTDANND FVGAVALTGNAIAVQDRNDLSIAAVRSGANA
1741 AIALVAGGDLNLPASQIDAGTGALT LTANGGTLRTAGALRGGT VQLTGASGIALSNTVTA
1801 SNALRLNSNNAAITQTGGALLVAGDTAVDAGGGAIALEAAGNDFQGV LALTGGASSVRDA
1861 NALT LGLT LNTGDLQVRNSGALNLGVGLVNGDLDAASNGGAVTQSGAVTVTGSARIDSGGA
1921 AIALTDAGNDFQAAVSLSGGTASVRDRNALVLGNLDVDALEVASGAGLDLGRGRIGGALV
1981 ARSGSAATANASTVVAQAI AVPAATAAGIAQQGALT VVGSSLLDAGTGAI V LDAADNDFQ
2041 GTVQARGSSIALVDRNDLAATAQASDALRLQAGGQLATAGMLSANAIALRGGTGVVLGHD
2101 IGGASVALSSGGAITQDAGNLRAGQLSGSAAGAVALTGSGNAIDVLGDFSAQGLDVLSNR
2161 TLLVSGRVAGGPSLRLRSGGELQLSGQLGGATSWLQAVAGIGQRAGSSITAGLLSGSAGG
2221 PVALGDAAGFIDNRVRLGDFVASNGFSFTNGGDL LVLANGSSYSVDAGNSAMFLSVRG
2281 NLFQDGRAPLRNGTGTFAATGQIGTQQNP IYVTGTGTQTVA AIGAPPAYFNATA ▼VDGSL
2340 LDLAGASGFNPASAFAGRAQSSASRTVAFVDLSAGGTPYRAFG LVRPGLRLPDDQQPAC
2400 VAGDPDAVCSPK 2411

```

Figura 15. Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC4113 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção do transposon ocorreu logo após a Alanina (A) da posição 2.334, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido, levando ao truncamento da proteína.

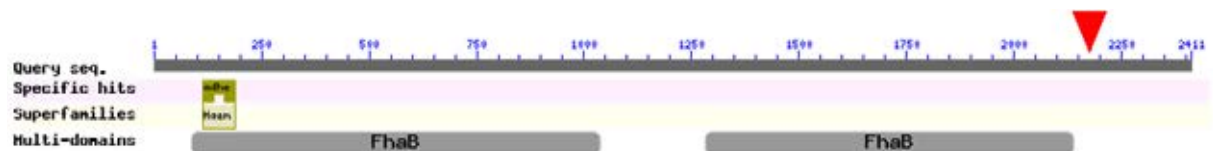


Figura 16. Domínios da proteína XAC4113. A proteína apresenta um domínio **adhes** de atividade de hemaglutinação na extremidade aminoterminal e dois domínios **FhaB** encontrados em exoproteínas de grande tamanho envolvidas na utilização do grupo heme ou na adesão: um na porção aminoterminal e outro na porção carboxiterminal. A inserção do transposon EZ-Tn5 ocorreu após o aminoácido 2.334, na porção carboxiterminal da proteína, logo após o domínio **FhaB**, como indicado pelo triângulo vermelho invertido.

Entre os primeiros eventos em muitas infecções bacterianas estão as interações moleculares que ocorrem entre o patógeno e as células do hospedeiro. Essas interações são normalmente necessárias para que ocorra a colonização extracelular ou internalização, e podem envolver uma complexa cascata molecular

cruzada na interface patógeno-hospedeiro. A aderência bacteriana é um passo crucial no início do processo de patogenicidade e é intercedida por adesinas específicas (GOTTIG et al., 2009; SOTO, HULTGREN 1999).

Adesinas são proteínas especializadas em exposição de superfície responsáveis por reconhecer e se ligar aos agrupamentos receptores específicos de células hospedeiras. Em muitos casos, as adesinas são reunidas em apêndices semelhantes aos pelos chamados pili ou fímbrias, que se prolongam para fora da superfície bacteriana. Em outros casos, as adesinas estão diretamente associadas a superfície de células microbianas. Coletivamente, essas adesinas e estruturas relacionadas são expressas em organismos associados a uma ampla variedade de doenças (SOTO, HULTGREN 1999).

Sequências de genomas de bactérias patogênicas indicam que múltiplas funções de adesinas são codificadas em seus genomas. Em parte, porque podem ajudar a ter redundância funcional em termos de fixação a uma superfície de um hospedeiro particular e, também, porque o patógeno requer múltiplas adesinas em diferentes fases do processo de infecção (DAS; RANGARAJ; SONTI, 2009)

Adesinas de patógenos bacterianos de animais têm sido amplamente estudados e são secretadas por um sistema de secreção tipo V de proteínas. Este sistema se destaca por sua aparente simplicidade, dispondo de duas vias distintas, a autotransportadora e a pertencente a um sistema de secreção de dois componentes (TPS) (GOTTIG et al., 2009; HENDERSON et al., 2004). Tanto o sistema autotransportador quanto o TPS translocam grandes proteínas ou domínios de proteínas, a maioria adesinas e hemolisinas, e foram identificados em muitos gêneros bacterianos, incluindo seres humanos, animais e plantas patogênicas (GOTTIG et al., 2009)

Buscando compreender o papel de genes que codificam adesinas no estabelecimento e virulência de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) em arroz, Das e colaboradores (2009) produziram mutantes de genes relacionados a adesinas, entre eles *yapH* e *pilQ*, por integração de plasmídeo recombinante através de recombinação homóloga, para analisar a interferência da mutação na capacidade de colonizar e penetrar o hospedeiro. Empregaram a microscopia de fluorescência verde em conjunção com a microscopia confocal para monitorar a função de várias

adesinas, assim como a adesão bacteriana à superfície foliar em estágios iniciais de entrada na folha. Eles observaram que a mutação no gene *yapH* exibiu uma redução na fixação de Xoo após a inoculação da superfície foliar em arroz, na migração na planta, assim como demonstrou uma redução da virulência quando comparada com a linhagem selvagem.

Várias adesinas estão envolvidas na virulência de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*, onde cada uma tem efeito parcial nesse processo. Tem sido relatado que bactérias patogênicas a animais empregam múltiplas adesinas para se fixar aos tecidos do hospedeiro, e mutações para genes em adesinas individuais causam a perda parcial de virulência (DAS; RANGARAJ; SONTI, 2009).

Darsonval e colaboradores (2009), avaliaram o papel da fixação da bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e a formação de biofilme no processo de colonização do feijão (*Phaseolus vulgaris*), através da mutação de cinco genes relacionados a adesividade, dentre eles *yapH* e *fhaB*. Verificaram que todos os mutantes ficaram prejudicados em sua capacidade de aderir ao filoplano ou semente. Além disso, constataram que *yapH* é necessário para a adesão à semente, folhas e superfícies abióticas, mas não na transmissão bacteriana para a semente ou agressividade em folhas. Nossos resultados corroboram com a hipótese apresentada pelos autores, já que a mutação no gene impossibilitou a infecção do patógeno no hospedeiro. Com isso pode-se inferir que a ausência de sintomas em planta se deve à falta de adesividade do fitopatógeno, pois é relacionada com adesinas formadoras de biofilme (ZIMARO et al., 2013).

No mutante XacM51 o transposon foi inserido entre a ORF XAC0361 (gene *glpR*) e a ORF XAC0362 (gene *pobB*) (Figura 17), distante 162 bases do códon de terminação da ORF XAC0362 (região 3' não traduzida) e 388 bases do códon de iniciação da ORF XAC0361 (região 5' não traduzida), estando inserido após a base 432348 (Figura 18). Por estar na região intergênica, esse mutante não afetou a sequência de aminoácidos de nenhuma das duas ORFs (Figura 19), assim como seus domínios (Figura 20 e 21).

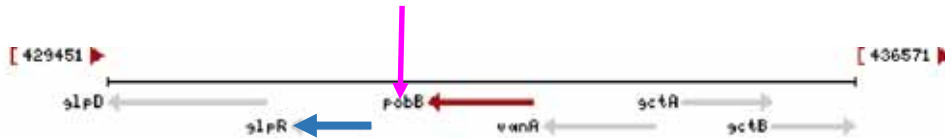


Figura 17. Localização das ORFs XAC0361 e XAC0362 no genoma da Xac. As ORFs XAC0361 (azul) e XAC 0362 (vermelha) estão localizadas na fita antisenso do DNA genômico, compreendendo as bases 431959 a 431189 e as bases 433493 a 432510 respectivamente. A seta rosa indica o local da inserção do transposon EZ-Tn5 no mutante.

433493ATGCGTAAAGACACCCAGTGGCATCGCGCCCGCGTCGTCAGCATTGCCGATGCCTGCCCGGGCGTGCGC
GAAATCGTGCTCGATCCCGGCAGCGCCGCACGCGGCTTCGAGGTGGGCAGCCATGTGGATTTCCTGTGCAGTTG
CATGGTCGCGACGATATGCGCTCGTATTCGTTGGTGGGCGAACCGCGCGCCGATGGCTACTACCAGATCGCAGTG
CGGCAGATGCCCGACAGCCGCGGCGGCTCGTTGCATATGTGGACGCTTGCGCCGGGCGATGTGGTGGAGATGTCG
CCGCCAGCAACAACCTTCGCGCTGGATGAAAGCGGCGAGGAAATCCTGCTCATCGCCGGCGGTATCGGCATTACA
CCCATCATCGGCATGGCGCAGCGGCTGGCGCGTCGCCATCGCGCGTTTCGTCTGCTACGCCGGCCGCTCGCGC
AGCGCATGGCGTATGTCGACACGCTGGAAGCACTGCTGGGCGAACGTTTGCAATTGCAATGCGACGACAGCGCC
GGCCCGCCGATCTGGCTGCCGAACCTGGCGCGCCTGTGCGCCAATGCCGAGGTGTATGTGTGCGGGCCGCTGGGC
ATGCTTGAAACGGTGCGCCAGCACTGGCACGCCGCCGGCGCGCTGCGCGCCTGCACCTCGAAACCTTCGGC
AATAGCGGGCGGGTGCTGCGCAGGCGTTTCGTGGTGAAAGTTGCCGGGGCTGGGCCCTGGAAGTGCCGGTAGCTGAA
AACGAATCGATGCTGGACGCACTGGCCGATGCCGGGGTGGAGCTGATCGCCGAGTGTCGCCGTGGCGAATGCGGC
CTGTGTGCACTGGAGGTGCTGGACAGCTCCGCCGATATCGATCACCAGCGACGTGTTCCCTCAGCGACGAGCAGCGC
CGGGAGAATCGCAAGCTCTGTGCCTGCGTGTGCGGTAGGCGGCAGCATCAGCATCGACACCGGCTATCGC
AGCGAGCTGGGCTTGA**432510**GTCCGCATCCGGCCGGCTGCACTCGTCGGGGCGACGGCGCGGCGGATGTCTGGA
CCCGGCATGTGCGGCTCTTACACTACCGCTGCGGCGTGCCGATCTTCAATCGCCTGCATGGGTGAGCACGGCGGC
GCTGAATCCCAGATCCCGCCGTTTCGTAGGAGC**432348**GCACCCGGGCGCGATGAAGCGTTACCGGTAATCCC
ATCGCGCCCTGGGGCGCTCCACGGTATCCGGTTGCTCCGGCGCGAGCTGCAGGCGCCCCGTCGGCCTCTGGCTG
ACGGCGTGTGCTTGGCGCATGGCTTGCCATGCGGTGATTGGCGCTCTCCCCGGGCGCAGACGGCCGGCAGCGATCT
CTCTGCGCGCTTGCCGAGCCTACGCCGTACGCCGGCCAGGCGCGCAGGCTCGATCGCGGCAGGCGGCGCCGTGTC
AGGCCGGTGCTCGCCATCGGGCGGTCACCGCTGGCGGCACGCACGCGCGCTGTTTTGCATCCTCACGCGCATGC
GCGATCATCTGCGCATGGAGTCGACTCACTACAGGACTGTCCGGCGCGCGGCC**431958**TTGAACCCGCGTCAGG
AGCAATGGTGGCGCTGGTGGCGCAGAGGGCTTTGCCGAGGTCAAGGTTTGGCCACACGCTTCGAGGTGACGCC
GCAGACCATCCGCCGCGATCTGACCTTGCTCTGCGATGCCGGCGTGCTGCGCCGCTATCACGGCGGCGTCAGCAT
GCCCTCCAGCGTGGAGAATCTGGCCTACACCGCACGCAAGGCACTGCAGGCCCGCGAAAAGCAGCACATCGCCGC
GCGTGTGCGCGCTTTCATTCCCAGCATGCCTCGCTGTTTCATCAACCTGGGCACCACCAACGAAGAAGTCGCACG
CGCGTTGCTGCAGACCGCGGACTCCGGGTGATCACCACCAACCTCAACGTGGCGGTGATGCTCAGCGCCCAACCC
CAGCTTCGAGGTGATCGTGGCCGGCGGCGTGGTGGCGGGCGCGACACGAGGCGTGACCGGCGAGGCGACGGTGGA
GCTGATCCGCCAGTTCAAGGTGGACTTCGGGGTGATCGGCATTTCCGGTATCGATCTGGACGGCACCCCTGCTGGA
TTTCGATTACCAGGAAGTGCGCGTGGCGCAGGCCATCATCGAACACTCGCGACAGTGCTGCTGGCCGCCGATCA
CAGCAAGTTCCGTCGCAACGCCATGGTGGCGCTGGGCGCCATCGCGCAGGTGCACGACTGGTTTACCAGCCGGCC
GCCGCCGAGGAGTTGGCGAGCGTGCTGGCCGAGGCCGGCACCCGGGTGCACCTGGCAGACGCGGACGGAACCGA
TTGA**431189**.

Figura 18. Sequência de nucleotídeos das ORFs XAC0361 e XAC0362 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 432348, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido, distante 162 bases do códon de terminação da ORF XAC0362 (região 3' não traduzida) e 388 bases do códon de iniciação da ORF XAC0361 (região 5' não traduzida). **ATG**: códon de iniciação de leitura da ORF XAC0362; e **TTG**: códon de iniciação de leitura da ORF XAC0362; **TGA**: códon de terminação.

A.

```

1  MNPRQEQQLVALVRQGGFAEVEGLATRFEVTPQTIRRDLTLLCDAGVLRRYHGGVSMPPSSV
61  ENLAYTARKALQAREKQHIAARVARFIPDDASLFINLGTTEEVARALLQHRGLRVITNN
121 LNVAVMLSANPSFEVIVAGGVVRGRDQGVTEATVELIRQFKVDFGVIGISGIDLDGTLL
181 DFDYQEVVRVAQAIIEHSRHVLLAADHSKFGRNAMVRLGAIAQVHDWFTDRPPPQELASVL
241 AEAGTRVHLADADGTD 256

```

B.

```

1  MRKDTQWHRARVVSADACPGVREIVLDPGSAARGFEVGSVDFRVQLHGRDDMRYSYSLV
61  GEPRADGYYQIAVRQMPDSRGGSLHMWTLAPGDVVEMSPPSNNFALDESCEEILLIAGGI
121 GITPIIGMAQRLARRHRAFRLLYAGRSRSAMAYVDTLEALLGERLQLQCDDSGPPDLAA
181 ELARLSPNAEVYVCGPLGMLTVRQHWHAAGRPRARLHFETFGNSGRVPAQAFVVKLPGL
241 GLEVPVAENESMLDALADAGVELIAECRRGECGLCAVEVLDSSADIDHRDVFLSDEQRRE
301 NRKLCACVSRVGGSSISIDTGYRSELG 327

```

Figura 19. Sequência de aminoácidos das proteínas codificadas pelas ORFs XAC0361 (A) e XAC0362 (B). A inserção do transposon EZ-Tn5 não afetou a sequência de aminoácidos das proteínas.

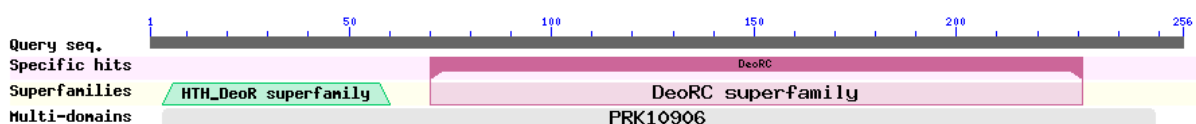


Figura 20. Domínios da proteína XAC0361. A proteína apresenta dois domínios conservados: um domínio de repressor do operon da desoxirribose na sua porção aminoterminal e domínio sensor DeoR na sua porção carboxiterminal. A inserção do transposon EZ-Tn5 não causou interrupção em nenhum destes domínios.

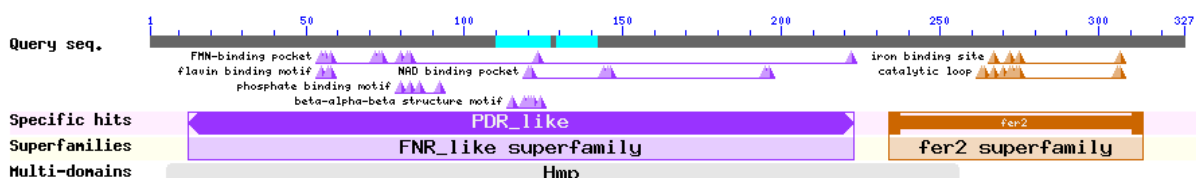


Figura 21. Domínios da proteína XAC0362. A proteína apresenta dois domínios conservados: um domínio de Ferredoxina redutase ligante de FAD na sua porção aminoterminal e um cluster ligante de ferro-enxofre (2Fe-2S) na sua porção carboxiterminal. A inserção do transposon EZ-Tn5 não causou interrupção em nenhum destes domínios.

A exceção à regra, um sitio de transcrição ativa, identificado no homem e no camundongo como U22, revelou-se como um “gene pelo avesso” pois demonstra inatividade transducional de seus éxons no RNA maduro, enquanto seus íntrons traduzem o transcrito s no RNA constituinte do RNA de nucléolos. No caso do U22, portanto, os éxons são inativos e os íntrons processados durante o *splicing* são

codificantes ativos. Os íntrons ainda são uma grande incógnita, podendo em alguns casos, possuir funções reguladoras da transcrição ou, gene pelo avesso U22 e, serem eles próprios sequências codificantes. (TYCOWSKI, SHU, STEITZ; 1994). Outros autores consideram a possibilidade dos íntrons serem sítios de amortização mutacional, protegendo assim os genes da maioria das alterações genéticas

Os resultados apresentados para essa mutação confirmam que houve uma alteração na sintomatologia devido à inserção do transposon o qual, provavelmente, impediu que o patógeno conseguisse infectar o seu hospedeiro. Entretanto, por estar o transposon inserido em uma região intergênica, não se pode afirmar com precisão qual dos dois genes foi diretamente afetado. Uma alternativa para esclarecer esse resultado seria analisar a expressão gênica de *glpR* e *pobB* empregando-se a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) quantitativo em tempo real. Somente a análise da expressão de ambos os genes poderá inferir qual foi afetado diretamente pela mutação com o transposon EZ-Tn5.

Já no mutante XacM71, o transposon EZ-Tn5 se inseriu na ORF 2773 (Figura 22), após a base 3.249.593 (Figura 23) na região regulatória 5' do gene *oar* (OmpA-related protein). A sequência de aminoácidos dessa proteína não foi alterada no momento da inserção (Figura 24), assim como os seus domínios (Figura 25).



Figura 22. Localização da ORF XAC2773 no genoma da Xac. A ORF está localizada na fita senso do DNA genômico, compreendendo as bases 3249880 a 3252990.

3249500TGGATGTGACGTTTCGAAC TGGGGCGTTGACAGGGTAGCCCCACCCTCAAGCCTCACGTGTTGCGTTTG
CATTGCCCTCTTCGGAGGGCAATGT **3249593**CGTTTGACGCTTGGTAGAGCGCACCTCACTTCTGGCCGCCG
CCAGTCGATGGTGGTTGCCAGTGA CTGGGAGCCAGCCATATTTCCCTAAGAAACAAAAAGATTGCCTGGCTGCA
AGTGCCAGAGTCATGAGGACCTGGTCTGAATACGCGTTTTTAGCTGTTTGTGCTTAAAAAACATGAAATTTAG
CGAAATTATTCTTTAAGCAGGCGGACCGCTCTCTAGCATCGGTTGTCAGCGCACCGTCATCTTCGTGACGGCGC
CCATCTGGAGAGCGATAGAG**3249880**ATGACCAGCCACGCCGCGCGGCAACGCCGCCCGTTTCGTTCCACGTCG
CCTGCGCGCTATGGCCGCATCAGCATGCTTGCCTTGCCTGAGCGGCGCCGTGGGCATGCTCGCCACCGGCACT
GCGGCCGCGCAAAGCACGACCGCCGGCATCTACGGAAGCGCGCCGCCAGTGCAGGCGCCACGGTCACCGCGCAG
AGCGACACCGGTTTGACGCGCACTGCAACCGTCGATGCCAATGGCCGTTATGCCATCGGCAACCTTCCGGTGGGC
ACCTACACCGTCACCTGCGAGCGGAAGGCCAGGCCGCCGAGACCGCAAGAACATCGCGCTGCGCGTCGGCGCC
GGCACCGATGTGTCCTTCGGCAGCAGCAATGCGTCCGACGACACTGCCACCCTGGGCACCATCACGGTGACCGGC
AAGAACATCTCGCCGGTGGACGTCTCCGCCACTGCTTCACGCACCGTCATCACGGCCGAGCAATTGCAACGCCTG
CCGCTGGCGCGCTCGGGCGAAGCGATCGCGCTGTTGTCGCCCGGTGCGGTGCAAGGCAGCGGCTATTTCCGCAAC

GCCATTTTCCTTCGGCGGGCGCCGGCGTTACCGAAAAACGCCTATTACCTCAATGGCTATCTCAGCTCCAATCCGCTG
 ACCAACATCGGGCGGTGTACCCCTGCCGTTTGGTGCCATCGATCAGCAGGAAACGTATACCGGGCGGCTATAGCGCC
 CGCTACGGCCGCTCGGGCCGGTGGCGTGCTCAGCCAGGTGGCAAGCGTGGCACCAACGAGTGGCATTTTGGCGCG
 CAGGCCCTTGTGGCGTCCGAGGTGCTGTCCAGCGACTACAAAAATGTCTTCTACCCCGATACCGCACCGCCTGCC
 GGCTATGAGTACAGCGACGAAAGCCTGCCAGGCACGCTTTACCGCAGCCGAAAGGACGACACCTTCTGGAACACG
 GTCTACAGCGTCTACGCTGGCGGCCCGCTGGTTCGAAGACCGCCTGTTTCGTGTTTCGTTGCCGCAGAGCAGGAACGC
 ACCGAAGGCGTTTCCACTGCACGCAGGGACGACCCGGTCATCGGCCGCAACAACATATCGCATTTGATGAGCCGAAG
 GTCTACGCCAAGATCGACTGGAACATCAACGACAGCAATATTCTCGAACTGACCGGGCGTCAAGAACAATTCTCGC
 GAAGGCGGTGCCTATACCGATTTCACCGGATACCCGGACGTTGTTCAGCGACGCCAACGGCGCATTCGCCGATACG
 GTCAAGGTCAACGACCGCTACTACATCGGCAAGTACACCAGCTATATCACCAGCATCTGACACTGAGCGCCACT
 TACGGCAAGAGCCGCCAGACCGACTTCCGCAACAACCCAGCACCAGCACCCTGCTGACCAACACCAATCTGCAG
 GACCCGGCCATCACCGGTGGCAGCGAGATACGCAACAACAGACCTCCAGCCAGGCACGCGACGGCGAAAACAAG
 ACGCGCGGCCCTGCGCATCGATCTGGAATACGTGCTGGGCAGCCACACACTGACCGCAGGCGTGGACAACATGTAT
 TTCAATGCCAACAACGAGGGCGTCATCACACGGGTCCAGGCTACCGCTGGATCTATGGCCGCTCTTCCCGCCCC
 ACCTCGCCCATCAGCGCTGCACTGGGCGTGGGTCCGGCCGGTGGCAACGGCTACTACGTGTATCGCTCGGTGTTT
 AATACGGCGACACAGCATGTACGTGCGCAGAAAGGCTTACTTCTCGAGGACAAGTGGCAAGTCAACGACAAGCTG
 TTGCTGACATTGGGTATCCGCAACGACAAGTTCACCAACTTCAACGATGCGGGCGAGGCTTACGTGACCAAGTGGC
 GACCAATGGGCGCCGCGCTGGGACTGAGCTGGGATGTGTTTCGGCGACTCGTCGCTGAAGGTGTACGGCAACGCA
 GGTGCTGATTACCTGGCGTTGCCCAACAGCGTGGCCATCCGTGGCGCATCGCCGTCCACTTTCACGCGCAATAC
 TTCACCTACTCCGGCATCGATGCGCAAGGCAGCCGACCGGACTGACGCCGGTTCGAGTGGATCCATCCGCCGGG
 TTCTCTGTTTCGGGCAACATCGTGTCTGTTCAATCTGGAATGCGGCCAGGCACCGGATGCCGCCGGCATCGCCGCC
 ACCGACCTGAAGTCGATGTACCAGGACGAGTTCATGCTTGGCTTCGACAAGACCTGGGCGAGAGTTGGGTACC
 GCGGCCAAGGCCACCTATCGCACGCTCGGCGCCACCATCGACGACGTCTGCGATGCGGACCGCATGCGGACAAAG
 TTGACGGCATCGGGCGTCGACCCGAGCACCGTCAACGTGCCCGTTGCATCATCTTCAATCCCGGCGAAACCAAT
 TCCTTCAGCCTCGCCAATCTCGATGGCTCGGGCCGACCTCGGTGACGATGTCGCCGTCGGACTGGGGCTTCGAC
 AAGAAGGCCAAGCGCACGTACCTGGCGGTGGACCTGTTCTGCGCATCCATTCGACGGCAAGTGGGAAGGCCGT
 ATCGACTACACCTGGTCGCGCAACTTCGGCAATACCGAGGGCCAGGTGAAATCCGATATCGGGCAGACCGATGTG
 TCCAAGACCCAGGATTGGGACGCTGCTGCGCTGATGTGGTACTCGGGCGGGTATCTGGCCAACGATCGCCGCCAT
 CAGATCAAGCTTTACGGCTCCTATCAGATCGCACCCGAATGGCTGATCGCGGGCAATATCCGCATCCTGTCCGGC
 ACCCCGAAATCCTGCCTGGGATATGTGAGCATCAACGGCATCAGCGAAGATTCCGATGCCGGCGATCCGGTGGGC
 TATGGTTCTTCGTACCACACCTGCAATGGCCAACCGTCGCGTCCGGGCGATGCGGGCCGGTTGCCGTGGACCAAG
 ATCGTCGACCTGGGCTGACCTATCGCCCGCGTTCGCGGACAACAAGCTCGCCATGACCTTGCAGGCCTTCAAC
 ATCTTCAACGAACGCAAGCCGCTGCAGGTGGATTTCGACCTGGGAGGATAGTGCCTTACAGCTGTCCAATACCTAC
 GGAATGGGGCTTTATTTTACCCAGCCGCTTACGCCATGTTCTCCGTGTCGTACGACTAC **TGA** 3252990 .

Figura 23. Sequência de nucleotídeos da ORF XAC2773 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 3.249.593, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido. A inserção ocorreu na região regulatória 5' e não na região codificadora. **ATG**: códon de iniciação de leitura; **TGA**: códon de terminação.

1 MTSHAARQRRPFRSTSPARYGRISMLALALSGAVGMLATGTAAAQSTTAGIYGSAPASAG
 61 ATVTAQSDTGLTRTATVDANGRYAIGNLPVGYTYTVTLQREGQAAETRNIALRVGAGTDV
 121 SFGSSNASDDTATLGTITVTGKNISPVDVSATASRTVITAEQLQRLPLARSGEAIALLS
 181 GAVQGSYFGNAISFGGAGVTENAYYLYLSSNPLTNIGGVTLPFGAIDQQETYYTGGYS
 241 ARYGRSAGGVLSQVGRGTNEWHFQAQALWRPRSLSSDYKNVFPDTPAPPAGYEYSDESL
 301 PGTLYRSRKDDTFWNTVYSVYAGGPLVEDRLFVFVAEEQERTEGVSTARRDDPVIGRNNY
 361 RIDEPKVYAKIDWNINDSNILELTGVKNNSREGGAYTDFNGYPDVSDANGAFADTVKVN
 421 DRYYIGKYTSYITDDLTLSATYGKSRQTDFRNNPSTAPLLTNTNLQDPAITGGSEIRNNQ
 481 TSSQARDGENKTRGLRIDLEYVLGSHTLTAGVDNMYFNANNEGVITTPGPGYRWIYGRSSR
 541 PTSPISAAALGVGPAGNGYVYRSVFNTATSMVAQKAYFLEDKWQVNDKLLLTGIRND

```

601 KFTNFNDAGEAYVTSGDQWAPRLGLSWDVFGDSSLKVYGNAGRYYLALPNSVAIRGASPS
661 TFTREYFTYSGIDAQGSPTGLTPVAVDPSAGFSCSGNIVSSNLECGQAPDAAGIAATDLK
721 SMYQDEFMLGFDKTLGESWVTGAKATYRTLGTATIDDVCDADRMRTKLTASGVDPSTVNPV
781 GCIIIFNPGETNSFSLANLDGSGRTSVTMSPSDWGFDDKKAKRTYLAVDLFLQHPFDGKWEQ
841 RIDYTWSRNFNGNTEGQVKSDIGQTDVSKTQDWDAAAALMWYSGGYLANDRRHQIKLYGSYQ
901 IAPewLIAGNIRILSGTPKSCSLGYVSINGISEDSDAGDPVGYGSSYHTCNGQPSRPGDAG
961 RLPWTKIVDLGLTYRPAFADNKLAMTLQAFNIFNERKPLQVDSTWEDSAFTLSNTYGMGL
1021 YFTQPRYAMFSVSYDY 1036

```

Figura 24. Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC2773. A inserção do transposon EZ-Tn5 não afetou a sequência de aminoácidos da proteína.

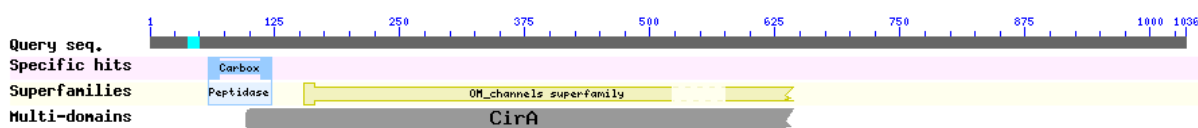


Figura 25. Domínios da proteína XAC2773. A proteína apresenta dois domínios conservados: um domínio semelhante à carboxipeptidase regulatória na sua porção aminoterminal e um receptor putativo de membrana externa/domínio de porina (canal na membrana externa). A inserção do transposon EZ-Tn5 não causou interrupção em nenhum destes domínios.

Foi identificada na bactéria *Myxococcus xanthus* uma proteína que tem semelhanças de sequência com OmpA, no qual o gene foi designado *oar*. É uma bactéria gram-negativa de desenvolvimento que forma corpos de frutificação multicelulares sobre inanição de nutrientes. Uma interrupção na mutação desse gene *oar* não mostrou nenhum efeito sobre o crescimento vegetativo, mas causou morfogênese anormal durante o desenvolvimento e reduziu a formação de myxospore. Quando examinada com um microscópio de luz, as células de *oar* não foram capazes de agregar em ágar de desenvolvimento, indicando que a proteína é necessária para adesividade celular durante o desenvolvimento (MARTINEZ-CANAMERO et al., 1993).

O gene *oar* está intimamente ligado à expressão de adesinas. A partir da interrupção desse gene, a produção de adesinas é também interrompida, dificultando dessa forma, a fixação da bactéria ao tecido do hospedeiro. A formação de biofilme é um processo importante para patógenos bacterianos e tal fato vem sendo discutido em diversos trabalhos, pois várias evidências sugerem que em *Xac*, este processo é um requisito para alcançar virulência máxima, uma vez que tem um papel importante nas interações com os hospedeiros. Os mutantes de *Xac* que são

incapazes de sintetizar moléculas necessárias para a formação de biofilme como exopolissacarídeos, adesinas e lipopolissacarídeos, mostram virulência reduzida (ZIMARO et al., 2013).

Zimaro e colaboradores (2014) demonstraram que processos multicelulares como motilidade e a formação de biofilme estão relacionados ao Sistema de Secreção do Tipo III (SST3). Os autores sugerem que esse sistema desempenha um papel importante na formação de biofilme bacteriano. Um dos fatores chave na patogenicidade de bactérias gram negativas de plantas e animais é o SST3 (GROSH, 2004; BÜTTNER; BONAS, 2010).

Com base nos resultados obtidos com o mutante XacM71, podemos deduzir que o processo infeccioso foi alterado porque o gene *oar* interrompido não produziu adesinas, a qual são descritas como essenciais para a fixação da Xac. Como a bactéria não conseguiu se fixar e desencadear o processo de infecção normalmente, a planta exibiu uma atenuação dos sintomas de cancro cítrico.

A outra ORF mutada pela inserção do transposon foi a ORF XAC0196 (Figura 26), a qual codifica uma proteína hipotética que abrange as bases 241932 a 242360, sendo que a inserção ocorreu após a base 242072 (Figura 27). A inserção do transposon interrompeu o códon do aminoácido Leucina levando ao truncamento da proteína (Figura 28). Igualmente atingiu a porção N terminal do domínio Paal_thioesterase dessa proteína (Figura 29).

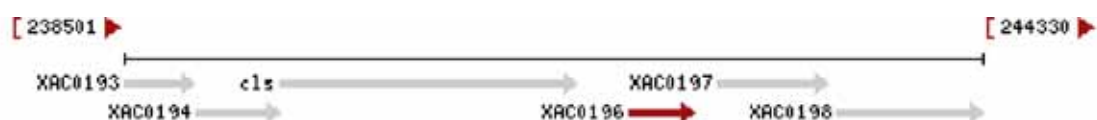


Figura 26. Localização da ORF XAC0196 no genoma da Xac. A ORF está localizada na fita senso do DNA genômico, compreendendo as bases 241932 a 242360.

241932ATGACCTTCCGCGAACCCGTCGATCTAGCCGCCCTCAATGCCGCCAGCCGCGATACCTTGATCGAGCAT
CTGGGCATCGTCTTCACCGAGGCCGGTGACGATTGGCTGCGCGCCACCATGCCGGTGGATGCGCGTACCAGGCAG
CCCTATGGCC▼242072TGCTGCACGGTGGCGCCTCGGTGGTGCTGGCCGAGACGGTGGGCAGCAGCGCCGGCAA
CCTGTGCGTGGATATGACGACCCAGATCTGCGTGGGCCTGGAGATCAATGCCAATCACCTGCGCGCTGCCACCCA
GGGGCTGGTGATCGGCACTGCGCGGGCGGTACATGTGGGGCGTAGCACGCATGTCTGGGACATCACCATCGAAAA
CCCCGCCGGCAAACGCGTCTGTGTGTCGCGATTGACCCCTGGCGGTGGTTCCACGCAGCAATGGCTGA242360

Figura 27. Sequência de nucleotídeos da ORF XAC0196 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. O transposon se inseriu após a base 242072, como indicado na sequência pelo

triângulo vermelho invertido. O códon C▼TG interrompido após a primeira base codifica o aminoácido Leucina (L). **ATG**: códon de iniciação de leitura; **TGA**: códon de terminação.

```

1  MTFREPVDLAALNAASRDTLIEHLGIVFTEAGDDWLRATMPVDARTRQPYG▼LLHGGASV
61  VLAETVGSSAGNLCVDMTTQICVGLEINANHLRAATQGLVIGTARAVHVGRSTHVWDITI
121 ENPAGKRVCVSRLTLAVVPRNSG

```

Figura 28. Sequência de aminoácidos da proteína codificada pela ORF XAC0196 e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção do transposon interrompeu após a Glicina (G) da posição 51, como indicado na sequência pelo triângulo vermelho invertido, e interrompeu o códon do aminoácido Leucina (L) 52, levando ao truncamento da proteína.

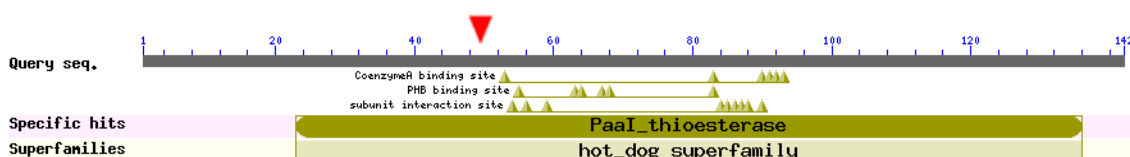


Figura 29 Domínios da proteína e local da inserção do transposon. A inserção do transposon ocorreu na porção N-terminal do domínio PaaI_thioesterase, como indicado pelo triângulo vermelho invertido.

A proteína hipotética localizada na ORF XAC0196 durante a inserção do transposon deverá ser estudada futuramente, já que quando interrompida interferiu no processo de infecção do patógeno no hospedeiro, demonstrando assim que pode ter ligação com a patogenicidade de Xac. As proteínas hipotéticas conservadas são alvos para novos estudos a respeito de suas funções.

Diante dos resultados obtidos, cabe aqui salientar que, os membros da família Xanthomonadaceae requerem um grande repertório de estruturas bacterianas para explorar os vários ambientes de seus hospedeiros. Por isso, vários genes diferentes devem estar envolvidos em diversos passos de colonização de seu hospedeiro e instalação da doença.

5 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, pode-se concluir que estudos como esse são importantes para elucidar fatores envolvidos na colonização de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* em seus hospedeiros, demonstrando que vários genes, bem como os ligados à adesividade, tem importância considerável já que interferem no estabelecimento do patógeno podendo reduzir ou inibir o processo de infecção. Da mesma forma, a identificação de uma proteína hipotética que quando interrompida diminuiu a sintomatologia da doença, também é uma informação relevante para o estudo do processo de infecção de Xac.

6 REFERÊNCIAS

ADAMI, A. C. O.; MIRANDA, S. H. G. Seguro sanitário para citricultura: oportunidades e desafios. **Revista de Política Agrícola**, v. 23, n. 1, p. 77-90, 2014. Disponível em: <https://seer.sede.embrapa.br/index.php/RPA/article/view/887>. Acesso em maio, 2014.

AGRIOS, GEORGE N., **Plant pathology** / George Agrios. – 5th ed, p. 223, 2005.

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFER AA, ZHANG JH, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

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

BELASQUE JR., J. **Dinâmica espacial do cancro cítrico, interação com a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) e diversidade genética do seu agente causal (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)**. 2005. 171 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BITANCOURT, A.A. O cancro cítrico. **O Biológico** 23:101-111. 1957.

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

CAMARGO, F. P.; FECHINE, V. M. R.; FRANCISCO, V. L. F. S.; AMARO, A. A. ; DE ALMEIDA, M. B.. Delineamento amostral para estimativa de safra brasileira de laranja. **Informações Econômicas**, SP, v. 42, n. 4, jul./ago. 2012.

CERNADAS, R. A.; CAMILLO, L. RODRIGUES; BENEDETTI, C. E. Transcriptional analysis of the sweet orange interaction with the citrus canker pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. citri and *Xanthomonas axonopodis* pv. aurantifolii. **Molecular Plant Pathology**, 2008.

CIVEROLO, E.L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, v. 37, p. 127-146, 1984.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Laranja, safra 2013/2014. Segunda Estimativa. São Paulo e Triângulo Mineiro. Agosto, 2013.

DA SILVA, A. C.R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; SLUYS MAV, ALMEIDA NF, ALVES L. M. C, DO AMARAL A. M, BERTOLINI M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N, M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; DOS 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**, v. 417, n. 6887, p. 459-463, 2002.

DARSONVAL, A.; DARRASSE, A.; DURAND, K.; BUREAU, C.; CESBRON, S.; JACQUES, M. A. Adhesion and fitness in the bean phyllosphere and transmission to

seed of *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 22, p. 747–757, 2009.

DAS, A.; RANGARAJ, N.; SONTI, R. V. Multiple Adhesin-Like Functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Are Involved in Promoting Leaf Attachment, Entry, and Virulence on Rice. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 22, n. 1, p. 73–85, 2009.

DOGRA, T.; PRIYADARSHINI, A.; KANIKA, KUMAR, A.; SINGH, N. K. Construction and characterization of random mutant library using tn5 transposome in mesorhizobium ciceri ca181. **International Journal of Agricultural Science and Research**, v. 4, n. 1, p. 101-106, 2013.

EPIBIO, 2014. [http://www.epibio.com/applications/transposomics-\(tn5\)-mutagenesis/applications-of-in-vitro-transposomics](http://www.epibio.com/applications/transposomics-(tn5)-mutagenesis/applications-of-in-vitro-transposomics). Acesso em: jun, 2014.

FUNDECITRUS. **Doenças e pragas**. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br>>. Acesso em: jan. 2014.

GACHOMO, E. W.; SHONUKAN, O. O.; KOTCHONI, S. O. The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 26–32, 2003.

GORYSHIN, I. L.; JENDRISAK, J.; HOFFMAN, L. M.; MEIS, R.; REZNIKOFF, W. S.; Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition compexes. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 97-100, 2000.

GORYSHIN, I. L.; REZNIKOFF, W. S. Tn5 in vitro transpositions. **J. Biological Chemistry**, v. 273, p. 7367-7374, 1998.

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. et al. Mechanisms of infection used by

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* in citrus canker disease. **Applied Microbiology**, p. 196–204, 2010.

GOTTIG, N. et al. A Filamentous Hemagglutinin-Like Protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the Phytopathogen Responsible for Citrus Canker, Is Involved in Bacterial Virulence. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, 2009.

GOTTWALD, T. R.; HUGHES, G.; GRAHAM, J. H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. **Phytopathology**, St Paul, v. 91, n. 1, p. 30–34, 2001.

GOTTWALD, T. R; GRAHAM, J.H. **Citrus canker**. 2000. Disponível em: APS American society of Phytopathology. Available at: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/CitrusCankerPort.aspx>. Acesso em: jan, 2014.

GRAHAM JH, GOTTWALD TR, CUBERO J, ACHOR DS: *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Mol Plant Pathol**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2004.

GHOSH, P. Process of protein transport by the type III secretion system. **Microbiol Mol Biol R**, v. 68, p. 771–795, 2004.

GUO, W.; CUI, Y. P.; LI, Y. R.; CHE, Y. Z.; YUAN, L.; et al. Identification of seven genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* potentially involved in pathogenesis in rice. **Microbiology**, v. 158, p. 505–518, 2012.

HASSE, C. H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 4, p. 97–100, 1915.

HARTUNG, J. S.; PRUVOST, O. P.; VILLEMOT, I.; ALVAREZ, A. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by

immunocapture and a nested polymerase chain reaction assay. **Phytopathology**, v. 86, p. 95–101, 1996.

HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). ***Xanthomonas***. London: Chapman & Hall, p. 1–17, 1993.

HENDERSON IR, NAVARRO-GARCIA F, DESVAUX M, FERNANDEZ RC, A'ALDEEN D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol Mol Biol Rev.**; v. 68, p. 692-744, 2004.

ITO M, KIM Y-G, TSUJI H, TAKAHASHI T, KIWAKI M, ET AL. Transposon Mutagenesis of Probiotic *Lactobacillus casei* Identifies *asnH*, an Asparagine Synthetase Gene Involved in Its Immune-Activating Capacity. **PLoS ONE** v. 9, n. 1, 2014.

JACIANI, F. J. **Diversidade Genética De *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri*, caracterização molecular e patogênica de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e detecção de *Xanthomonas alfalfae* em citrumelo 'swingle' (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) no Brasil.** 2012. 191 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

JACIANI, F. J. **Diversidade genética de espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros baseada em genes *avr* e *leucine rich protein*.** 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

JUDSON N, MEKALANOS JJ. Transposon-based approaches to identify essential bacterial genes. **Trends Microbiol** v. 8, n. 11, p. 521–526, 2000.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; BRIGATI, J. B.; FERREIRA, C. B.; FERRO, M. I. T.; SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; OLIVEIRA, J. C. F. New genes of

Xanthomonas citri subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 12, 2009.

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

MARTINEZ-CANAMERO, M.; MUNOZ-DORADO, J.; FAREZ-VIDAL, E.; INOUE, M.; INOUE, S. Oar, a 115-kilodalton membrane protein required for development of *Myxococcus xanthus*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 15, p. 4756-4763, 1993.

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, M.; BELASQUE, J.; AMARAL, A. M. do; TABOGA, S. R.; FERREIRA, H. Sub cellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**. p. 1-8. 2010.

MISKEY, C.; IZSVÁK, Z.; KAWAKAMIC, K.; IVICSA, Z. DNA transposons in vertebrate functional genomics. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 62, n. 6, p. 629–41, mar. 2005.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA JR., N. F.; POTNIS, N.; DIGIAMPIETRI, L. A.; ADI, S. S.; BORTOLOSSI, J. C.; DA SILVA, A. C.; DA SILVA, A. M.; DE MORAES, F. E.; DE OLIVEIRA, J. C.; DE SOUZA, R. F.; FACINCANI, A. P.; FERRAZ, A. L.; FERRO, M. I. T.; FURLAN, L. R.; GIMENEZ, D. F.; JONES, J. B.; KITAJIMA, E. W.; LAIA, M. L.; LEITE JR., R. P.; NISHIYAMA, M. Y.; RODRIGUES NETO, J.; NOCITI, L. A.; NORMAN, D. J.; OSTROSKI, E. H.; PEREIRA JR., 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**, London, v. 11, artigo 238, 2010.

MOREIRA, L. M. et al. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annual review of phytopathology**, v. 42, p. 163–84, jan. 2004.

NEVES, M. F. (Org.). **O retrato da Citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010. 138 p. Disponível em: <http://www.citrusbr.com.br/download/Retrato_Citricultura_Brasileira_Marcos_Fava.pdf> Acesso em: jan. 2014.

NEVES, M. F.; LOPES, F. F.; TROMBIN, V. G.; AMARO, A. A.; NEVES, E. M.; ANK, M. S. **Caminhos para a citricultura**: uma agenda para manter a liderança mundial. São Paulo: Atlas, 110 p. 2007.

OLIVEIRA, R.P.; SCIVITTARO, W.B.; ROCHA, P.S.G. Cultivares de laranjeiras resistentes ao cancro cítrico (Documento 249). Pelotas: **Embrapa Clima Temperado**, 31 p. 2008.

RODRIGUEZ, O. et al. **Citricultura Brasileira**. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill, 941 p. 1991.

ROSSETTI, V. V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq/Fundecitros, 207 p. 2001.

ROTT, P.; FLEITES, L.; MARLOW, G.; ROYER, M.; GABRIEL, D. W. Identification of new candidate pathogenicity factors in the xylem-invading pathogen *Xanthomonas albilineans* by transposon mutagenesis. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 24, n. 5, p. 594–605, maio 2011.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 8, p. 690–695, 2006.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. H.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, P. E.; STROMBERG, V. K.; VIDAVER, A. K. Reclassification of

Xanthomonas campestris pv. *citri* (ex Hasse) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *Smithii* nov.comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom.rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X.fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov.. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, n. 6, p. 494–518, 2005.

SHIMAOKA, M., TAKENAKA, Y., KURAHASHI, O., KAWASAKI, H. & MATSUI, H. Effect of amplification of desensitized *purF* and *prs* on inosine accumulation in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 103, 255–261, 2007.

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

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JONES, J. D. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, Washington, v. 268, n. 5211, p. 661–667, 1995.

SOTO, G. E., AND HULTGREN, S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. **Journal of Bacteriology**, n.181, p.1059-1071, 1999.

TYCOWSKI, K. T.; SHU, M. D.; STEITZ, J. A. Requirement for intron-encoded U22 small nucleolar RNA in 18S ribosomal RNA maturation. **Science**, v. 266, n. 5190, p. 1558-1561, 1994.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Citrus: world markets and trade**. 2013. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>. Acesso em: jan, 2013.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 472–489, 1995.

VIDAL, J. E.; CHEN, J.; LI, J.; MCCLANE, B.A. Use of an EZ-Tn5-Based Random Mutagenesis System to Identify a Novel Toxin Regulatory Locus in *Clostridium perfringens* Strain 13. **PLoS ONE**, v. 4, n.7, p. 6232, 2009.

WHITE, F. F.; YANG, B.; JOHNSON, L. B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, n. 4, p. 291–298, 2000.

WULFF, N. A. **Caracterização enzimática das celulases xf – 810 , xf – 818 e xf – 2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína xf – 818 , expressas em *Escherichia coli*. 2002.** 208 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Esalq, Piracicaba, 2002.

YAMAOKA, T.; YANO, M.; KONDO, M. et al. Feedback inhibition of amidophosphoribosyltransferase regulates the rate of cell growth via purine nucleotide, DNA and protein synthesis. **Journal Biological Chemistry**, v. 276, n. 24, p.21285-21291, 2001.

ZIMARO, T. et al. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 96, jan. 2014.

ZIMARO, T. et al. Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv . *citri* biofilm through proteomics. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALMEIDA, S. C. CITRICULTURA E AGRONEGÓCIO COOPERATIVO NO BRASIL. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v(11), nº 11, p. 2290-2306, JUN, 2013.