

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE
MUTANTES DA BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA**
Xanthomonas citri subsp. *citri*.

Cristiano Barbalho Ferreira
Biólogo

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE
MUTANTES DA BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA**
Xanthomonas citri subsp. *citri*.

Cristiano Barbalho Ferreira

Orientadora: **Profa. Dra. Maria Inês Tirabochi Ferro**
Co-orientador: **Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira**

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 Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

Jaboticabal - SP
Novembro de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CRISTIANO BARBALHO FERREIRA - Nascido em 28 de Julho de 1979, em Jaboticabal, São Paulo, Brasil. Filho de Gerson Julio Ferreira e Isabel Cristina Soares Barbalho. Biólogo formado em Dezembro de 2006 pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP - Câmpus de Jaboticabal. Ingressou em Março de 2007 na mesma instituição no curso de Mestrado em Agronomia, na área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado disposição e Saúde durante toda a minha vida, o que possibilitou eu chegar até aqui e concretizar a realização deste sonho.

À Minha orientadora profa Dra Maria Inês Tiraboschi Ferro e ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro pela oportunidade de fazer parte da LBM, pelas dicas, ensinamentos e principalmente pelos conselhos, Broncas e “puxões de orelha” que muito me ajudou no meu amadurecimento profissional e pessoal.

À meu co-orientador Prof. Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira pela co-orientação, ensinamentos e demais serviços em prol desta dissertação.

Ao Marcelo Luiz de Laia pela sua orientação prestada, paciência e amizade, dada durante a realização deste trabalho.

À todos os membros que atualmente estão ou que já estiveram na LBM, em especial ao Rafael Homem, Joice, Juliana dezaújo, Juliana Vantini, Flavia, Julinho, Thais, Gustavo, Dani, Agda, Karina, Rafael Marine, Tiago, Juliana de Antonio, Gisele, Fabrício, Renata, Flavinha e Elaine pelas dicas, sugestões, conversas e principalmente pelas boas risadas dadas entre um experimento e outro.

Aos membros da Comissão Examinadora pela disponibilidade de tempo, sugestões e primor na correção deste trabalho.

A FUNDECITRUS e CAPES, pela concessão de bolsa de estudo e FAPESP pelos recursos proporcionados por meio do Auxílio Jovem Pesquisador nº 04/02006-7, as quais sem este trabalho não seria possível.

À minha querida mãe Isabel Cristina Soares Barbalho por ter me criado e ter feito de tudo para me dar condições para que eu chegasse até aqui, e por ter sempre incutido em minha mente a importância da educação.

E a todos os outros que de alguma forma me ajudaram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
RESUMO	VII
SUMMARY	VIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 ASPECTOS ECONÔMICOS.....	2
2.2 <i>XANTHOMONAS CITRI</i> SUBSP. <i>CITRI</i> (<i>X. CITRI</i>)	4
2.3 DOENÇA	7
2.4 ASPECTOS MOLECULARES DA INTERAÇÃO PLANTA-PATÓGENO.....	10
2.5 O GENOMA DA <i>X. CITRI</i>	15
2.6 ETAPA PÓS-GENOMA DA <i>X. CITRI</i>	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO E ARMAZENAMENTO.....	18
3.2 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA.....	20
3.3 SEQÜENCIAMENTO	21
3.3.1 <i>Extração de DNA genômico total</i>	21
3.3.2 <i>Clivagem e Reação de Ligação</i>	22
3.3.3 <i>Preparo de Células Eletro-competentes</i>	23
3.3.4 <i>Transformação de E. coli</i>	24
3.3.5 <i>Extração de DNA plasmidial</i>	25
3.3.6 <i>PCR e Seqüenciamento do gene mutado</i>	26
3.4 ANÁLISE FITOPATOLÓGICA	28
3.4.1 <i>Curva de crescimento in vitro</i>	28
3.4.2 <i>Curva de Crescimento in vivo</i>	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 SEQÜENCIAMENTO	32
4.2 CURVA DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i>	34
4.3 AVALIAÇÕES FENOTÍPICAS E CURVAS DE CRESCIMENTO <i>IN VIVO</i>	36
5 CONCLUSÃO.....	58
6 REFERÊNCIAS	60
7 ANEXOS	74
7.1 ANEXO A - LABORATÓRIO DE PLANTAS	74
7.2 ANEXO B - CURVA DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i>	75
7.3 ANEXO C - CURVA DE CRESCIMENTO <i>IN VIVO</i>	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01: Incidência de cancro cítrico ente 1999 a 2008.....	3
Figura 02: Distribuição mundial do cancro cítrico	6
Figura 03: <i>X. citri</i> penetrando pelo estômato	8
Figura 04: Sintomas de cancro cítrico em folhas, frutos e ramos	8
Figura 05: Ciclo do Cancro Cítrico	9
Figura 06: Comparação entre os agrupamentos <i>hrp</i> de quatro patovares de <i>Xanthomonas</i> ..	13
Figura 07: Estocagem de clones de mutantes em ultrafreezer, - 80°C	19
Figura 08: Esquema mostrando o plasmídeo e como os oligonucleotídeos iniciadores executam sua função no seqüenciamento	27
Figura 09: Curvas de crescimento <i>in vitro</i> dos mutantes 18A1, 23H2, 25D11, 29H9, 32F2 e 33F8	34
Figura 10: Curva de crescimento <i>in vitro</i> integrando os mutantes 18A1, 23H2, 25D11, 29H9, 32F2 e 33F8	35
Figura 11: Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento <i>In vivo</i> dos mutantes 28B8, 28C4, 29C8 e 30A10	37
Figura 12: Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento <i>In vivo</i> dos mutantes 33G3, 29G9 e 29H9	40
Figura 13: Avaliações Fenotípicas dos mutantes 30A8 e 34G10.....	41
Figura 14: Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento <i>In vivo</i> dos mutantes 21C12, 23H2, 25D11 e 30F6	43
Figura 15: Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento <i>In vivo</i> dos mutantes 25G7, 33B11 e 18A1	46
Figura 16: Avaliação Fenotípica do mutante 32D3	47
Figura 17: Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento <i>in vivo</i> dos mutantes 31B11, 32E6, 33F8 e 34H11	48

Figura 18: Avaliações fenotípicas dos mutantes 21B10, 22A11 e 23H1.....	50
Figura 19: Avaliação Fenotípica e Curva de crescimento <i>in vivo</i> do mutante 32F2.....	51
Figura 20: Avaliações fenotípicas dos mutantes 28A12, 29G5, 32F10 e 33E4.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01: Relação dos genes seqüenciados	33
Tabela 02: Mutantes que levaram a perda total de patogenicidade em laranja e limão	37
Tabela 03: Mutantes que levaram a perda total de patogenicidade em limão e parcial em laranja.....	42
Tabela 04: Mutantes que levaram a perda total de hiperplasia e parcial de necrose	48
Tabela 05: Mutantes que levaram a ausência e/ou diminuição de hiperplasia e/ou necrose	51
Tabela 06: Mutantes que levaram a nenhuma modificação aparente dos sintomas de cancro cítrico	53
Tabela 07: Mutantes que levaram a um aumento de necrose.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	("amplified fragment lenght polymorphism") Polimorfismo dos Fragmentos Amplificados
<i>Avr</i>	Gene de avirulência
DNA	("Deoxyribonucleic acid") Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
EPS	("Extracellular polysaccharide") Polissacarídeo Extracelular
EUA	Estados Unidos da América
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Grama(s)
h	Hora(s)
HR	("Hypersensitivity Response") Reação de Hipersensibilidade
<i>hrp</i>	("hypersensitive response and pathogenicity") Genes de patogenicidade e resposta de hipersensibilidade
<i>In vitro</i>	Em ambiente artificial (Meio de cultura)
<i>In vivo</i>	Em ambiente natural (Hospedeiro natural)
L	Litro(s)
Mim	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
pBS KII	Plasmídeo pBlueScript II SK Stratagene
PCR	("Polymerase Chain Reaction") Reação de Polimerase em Cadeia
<i>rpf</i>	Fatores reguladores de patogenicidade
rpm	Rotações por Minuto
SSTD	Sistema de Secreção Tipo II
SSTQ	Sistema de Secreção Tipo IV
SSTT	Sistema de Secreção Tipo III
s	Segundo(s)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)

Xac	(“ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> ”) <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>Citri</i>
Xfa-B	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> estirpe B
Xfa-C	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> estirpe C
Xfa-D	<i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>aurantifolii</i> estirpe D
<i>X. citri</i>	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE MUTANTES DA BACTÉRIA FITOPATOGÊNICA *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

RESUMO - Dentro da comercialização de frutas, a citricultura é a mais importante. Representa para muitos países, dentre eles, os EUA e o Brasil, uma importante atividade econômica. Porém, esta atividade, vem sofrendo com inúmeras doenças e/ou pragas como a doença do Cancro Cítrico Asiático causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). Deste modo, com o objetivo do estudo do genoma funcional da *X. citri*, um banco de mutantes deste microorganismo foi obtido por meio de inserção aleatória do transposon Tn5, nas quais foram selecionados 53 mutantes que apresentaram, de forma superficial, alterações fenotípicas em relação à *X. citri* selvagem. Para uma avaliação mais precisa, eles passaram por uma nova confirmação de suas alterações fenotípicas, onde foram inoculados em folhas de *Citrus sinensis* (Laranjeira pêra-Rio) e *Citrus limonia* (limoeiro cravo) e monitorados durante 16 dias, e aqueles que apresentaram as maiores alterações em relação à selvagem, tiveram confeccionadas para si curvas de crescimento *in vivo*. Conseguiu-se, desta forma, avaliar quantitativamente o processo patogênico, relacionar seus sintomas com dados numéricos e ainda descobrir detalhes até então não conhecidos. O mapeamento, dos respectivos *loci* mutados, foi realizado por seqüenciamento de DNA a partir do transposon, demonstrando que a metodologia empregada para a obtenção dos mutantes foi eficiente, conseguiu também revelar diversas proteína ainda hipotéticas, e outras, até então, não considerados como implicados no processo patogênico, como, uma Integrase, Fe-S oxidoreductase, Helicase IV, Receptor Dependente de Ton-B, entre outros.

Palavras-chave: Bactérias fitopatogênicas, Cancro cítrico, Curvas de crescimento *in vivo*, Genoma funcional, Interação patógeno-hospedeiro

PHENOTYPIC AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF MUTANTS OF PHYTOPATHOGENIC *Xanthomonas citri* subsp. *citri*.

SUMMARY - Concerning the commercialization of fruits, the citrus production is the most important. It represents for many countries, amongst them, U.S.A. and Brazil, an important economic activity. However, this activity has been suffering with many illnesses and/or plagues as the illness from the Asiatic citrus canker caused by the *Xanthomonas citri* subsp. *citri* bacterium (*X. citri*). In this way, from a bank of mutants of *X. citri*, gotten by means of random insertion of commercial one derived from transposon Tn5, had been selected 53 mutants that had presented, of superficial form, some type of phenotype alteration in relation to the wild *X. citri*. To a more necessary evaluation, each one of them passed for a new confirmation of its phenotype alterations, where they had been inoculated in leafs of *Citrus sinensis* ('Pera' sweet orange) and *Citrus limonia* ('Rangpur' lime) and monitored during 16 days, and those that had presented the biggest alterations in relation to the savage, had confectioned for itself in planta growth curves. We obtain, in such a way, to evaluate quantitatively the pathogenic process, to relate its symptoms with numerical data and still to discover not known details until then. The mapping of respective locus mutated was carried through by sequencing of DNA from transposon, demonstrating that the methodology used for the attainment of the mutants was efficient and still to disclose diverse genes still hypothetical, and others, until then, not considered as implied in the pathogenic process, as, Integrase, Fe-S oxidoreductase, Helicase IV, TonB-dependent receptor, among others.

Keywords: Plant pathogenic bacteria; citrus canker; growth curves *in plant*, functional genomics, pathogen-host interaction.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de citros, sendo a citricultura a principal atividade econômica de mais de 300 municípios do Estado de São Paulo e do Triângulo Mineiro. No entanto, este setor vem sofrendo milhões em prejuízos devido à bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, responsável pela doença denominada cancro cítrico. A bactéria citada consegue sobreviver em vários ambientes por quase um ano, e é altamente contagiosa. A guinada para uma perspectiva de controle mais efetivo desta doença aconteceu a partir do seqüenciamento completo dos genomas das bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, que abriu a possibilidade de utilização de estratégias de análise genômica funcional no estudo das funções de genes implicados na colonização do patógeno na planta hospedeira, e conseqüentemente no desenvolvimento de uma cura para a doença.

Com o objetivo de avaliar o papel das proteínas sintetizadas a partir do genoma da *X. citri* no processo patogênico, um banco de mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* foi obtido por meio de inserção aleatória do transposon Tn5. Cerca de 3.300 destes mutantes foram analisados e destes, 100 apresentaram patogenicidade alterada em comparação a bactéria selvagem. Dentre estes, 53 foram selecionados para uma avaliação qualitativa, onde foram avaliados fenotipicamente em folhas de Laranja pêra-rio (*Citrus limonia*) e limão cravo (*Citrus sinensis*) durante os primeiros 16 dias de contágio. Realizada esta avaliação 49 destes mutantes tiveram o gene interrompido determinado por seqüenciamento, a *Xanthomonas citri* subsp. *citri* selvagem e 19 mutantes, que apresentaram os menores níveis de patogenicidade, foram reavaliados, agora quantitativamente por meio de curvas de crescimento *in vivo*, e enfim alguns destes mutantes foram avaliados por meio de curvas de crescimento *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Econômicos

A citricultura é a principal atividade econômica de mais de 300 municípios do Estado de São Paulo e Triângulo Mineiro (FUNDECITRUS, 2009b). No Estado de São Paulo é a segunda atividade rural em importância, menor apenas que a cana-de-açúcar. São pequenos produtores que movimentam a indústria (fábricas de extração de suco) e o comércio regional, por meio de milhares de empregos diretos e indiretos (FUNDECITRUS, 2009c). No contexto Internacional, o Brasil é o maior produtor de laranja, respondendo por mais de 25% da produção mundial (BASSANEZI e LARANJEIRA, 2007), e também o maior exportador de suco concentrado, com participação de 53% do suco comercializado no mundo (FUNDECITRUS, 2009b) o que rendeu ao Brasil em 2008 mais de 2 bilhões de dólares em exportações (CONAB, 2009).

No entanto, este setor vem sofrendo severos prejuízos devido a diversas doenças e/ou pragas. Dentre elas, a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*), causadora do Cancro Cítrico Asiático que foi introduzida no país em 1957 na região de Presidente Prudente, SP, por meio de mudas trazidas clandestinamente por imigrantes Japoneses (HASSE, 1987), e ainda hoje causa perdas significativas ao país.

O cancro cítrico é considerado uma “praga” quarentenária, ou seja, a não adoção de medidas de exclusão/erradicação, caso esta bactéria seja detectada, impede o comércio de frutos cítricos, suco concentrado e seus derivados para países livres do patógeno, já que, o comércio destes produtos é regulamentado por legislação internacional (FUNDECITRUS, 2009d).

Como não há arsenal químico capaz de controlar satisfatoriamente a doença, o único meio de evitar a sua proliferação é a erradicação dos pés contaminados e demais plantas vizinhas num raio de 30 metros. Além disso, caso seja detectado um grau de contaminação maior que 0,5% do talhão, este deve ser dizimado por completo e toda

área permanecer sem uso para cultivo de citrus durante dois anos (FUNDECITRUS, 2009d). Tais medidas drásticas, apesar de necessárias, já que sem elas o prejuízo seria ainda maior, resultaram e ainda resultam em grandes perdas de áreas de cultivo e conseqüentemente em milhões de reais em prejuízos para o país. Ainda segundo a FUNDECITRUS, depois de décadas de esforços e milhões em prejuízos provocados pela doença e outros milhões gastos na tentativa de seu controle, o ano de 2008 constatou que 0,17% dos pomares apresentaram a doença, conforme pode ser visto na **Figura 01**.

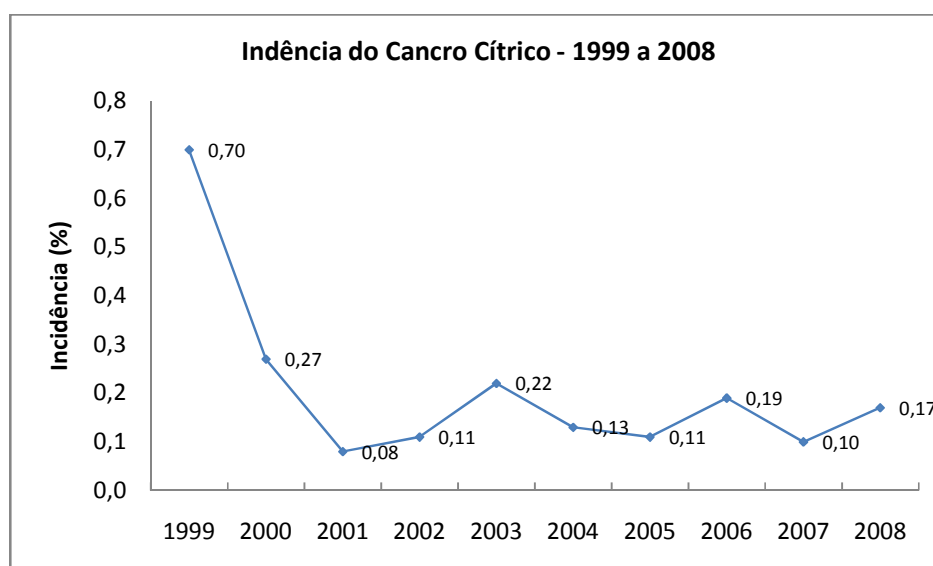


Figura 01: Incidência de cancro cítrico ente 1999 a 2008. Fonte: FUNDECITRUS, 2009a.

Apesar da boa campanha de prevenção, é preciso ter em mente que o Cancro Cítrico ainda causa grandes prejuízos. Tem freqüentemente ressurgido, inclusive em áreas onde se pensava que estivesse erradicado. O índice superior ao do ano anterior (0,10%), por exemplo, se deve ao aparecimento de focos em regiões onde não havia sido diagnosticada incidência anteriormente (FUNDECITRUS, 2009a). Além disso, o número de plantas erradicadas em 2008, devido à ocorrência de cancro cítrico em talhões, pomares não comerciais, viveiros e zona urbana no estado de São Paulo e Sul do Triângulo Mineiro, ainda fora de 478.623 plantas. (FUNDECITRUS, 2009e).

Tais fatos evidenciam a importância de medidas preventivas como uma vigilância constante e um contínuo investimento na área da pesquisa.

2.2 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*)

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pertence ao gênero *Xanthomonas* (do grego, “xanthos” = amarelo; “monas” = unidade), que constitui-se no maior grupo de bactéria fitopatogênicas dispersos na natureza, com capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros que incluem, pelo menos, 68 famílias de plantas e mais de 240 gêneros (HAYWARD, 1993), sendo que, deste total, 120 são monocotiledôneas e 280 dicotiledôneas (LEYNS et al., 1984).

Identificada e isolada primeiramente por CLARA H. HASSE (1915) que, após provar a patogenicidade da *X. citri*, classificou-a como *Pseudomonas citri*. A partir de 1949, DOWSON reclassificou a bactéria como *Xanthomonas citri* (KHAN E HINGORANI, 1970). Cerca de 45 anos depois foi novamente reclassificada como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (VAUTERIN et al., 1995; HARTUNG et al. 1996) e mais recentemente, já em 2006, ela teve seu nome modificado mais uma vez para *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SCHAAD et al., 2006).

A recente reclassificação das espécies de *Xanthomonas* patogênicas a citros foi baseada em análises do espaço intergênico 16S-23S, AFLP e re-associação DNA-DNA (SCHAAD et al., 2006). Antes pertencentes a uma mesma espécie bacteriana (*Xanthomonas axonopodis*) e separados 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* (= *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*), *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (= *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii*) e *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis* (= *Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*) (SCHAAD et al., 2005; SCHAAD et al., 2006). De acordo com esta recente classificação filogenética a bactéria *X. citri* pertence ao filo Proteobacteria, classe “Gammaproteobacteria” (Classe III), ordem “Xanthomonadales” (Ordem II), família “Xanthomonadaceae” e gênero *Xanthomonas* (GARRITY e HOLT, 2000).

Apesar da recente mudança de nomenclatura, a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é ainda hoje amplamente conhecida e encontrada na literatura pela denominação *Xac*, já que em 2002 quando foi finalizado o seqüenciamento completo do

seu genoma (SILVA et al., 2002) seu nome ainda era *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* (*Xac*).

A *X. citri* possui a forma de bastonete reto com 1,5 a 2,0 μ M de comprimento e 0,5 a 0,7 μ M de largura. É uniflagelada polar (monotríquia), gram-negativa, aeróbica obrigatória, não fixadora de nitrogênio, não forma esporos e não é exigente nutricionalmente (GALLI, 1980). Raramente encontrada livre no solo, sendo altamente adaptada ao crescimento endofítico (SWINGS e CIVEROLO, 1993).

Forma colônias amarelas e mucóides na maioria dos meios de cultura artificiais, devido à produção do pigmento xanthomonadina (importante na proteção contra raios ultravioleta) (BRADBURY, 1993) e de goma xantana (exopolissacarídeo que auxilia na dispersão e sobrevivência do patógeno, além de ser uma importante matéria prima na indústria de alimentos e petróleo). Colônias são visíveis após dois a três dias de incubação a 28º e seu tom pode variar de claro a escuro (VAUTERIN et al., 1996; DIANESE e SCHAAD, 1982; TSUYUMU et al., 1996).

É cosmopolita, podendo ser encontrada em inúmeros países da Ásia, África, Oceania e América (**Figura 02**) e causa a doença intitulada cancro cítrico asiático, também conhecida como Cancrose A. Ataca todas as variedades e espécies de citros e é a mais devastadora de todas as espécies de *Xanthomonas* que provocam o cancro (WHITESIDE et al., 1996; NAMEKATA et al., 1996; KOLLER, 1994; ROSSETTI, 1993). Entretanto há uma variação quanto à suscetibilidade com que estas variedades possuem em relação ao patógeno. Em ordem crescente de suscetibilidade temos: Poncan, Mexerica do rio, Limão Tahiti, Laranja Pêra, Laranja Valência, Laranja Natal, Tangor Murcote, Limão Cravo, Laranja Hamlin, Laranja Baianinha, Limão Siciliano, Limão Galego e Pomelo (FUNDECITRUS, 2009d).

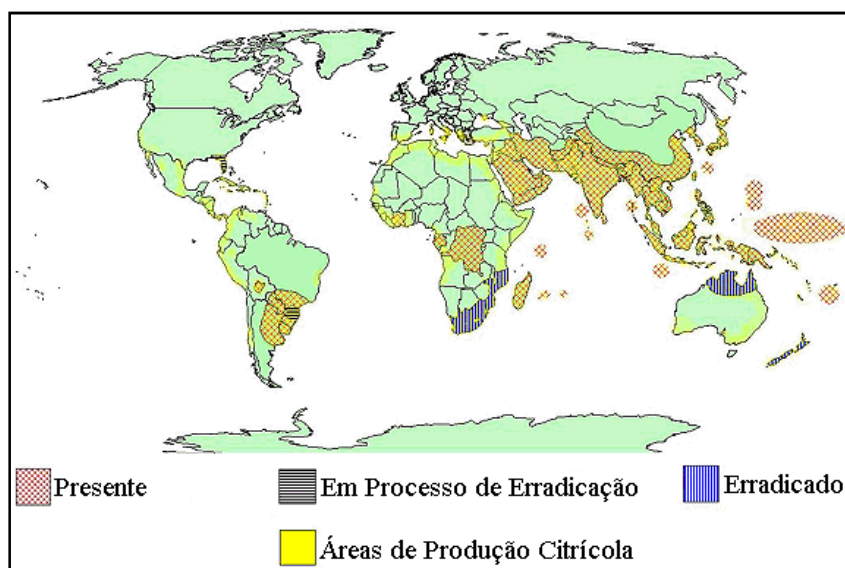


Figura 02: Distribuição mundial do cancro cítrico. Fonte: PLANT MANAGEMENT NETWORK, 2009. (Imagem modificada).

Há outras espécies dentro do gênero *Xanthomonas* que também provocam o Cancro. A cancrose B ou “Falso Cancro” é provocada pela estirpe B de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (*Xfa-B*) e ocorre em um menor número de espécies de citros e de uma forma bem mais lenta e branda do que a cancrose A e restringe-se a Argentina, Paraguai e Uruguai (ROSSETTI, 2001). A estirpe C de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (*Xfa-C*) é causadora da cancrose C, possui apenas o limoeiro galego (*Citrus aurantifolia*) como hospedeiro e é endêmico de algumas regiões do estado de São Paulo (AMARAL, 2003). A cancrose D é causada pela estirpe D de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (*Xfa-D*) e foi relatada apenas no México e ainda não esta bem caracterizada, mas causa lesões em folhas e ramos de limoeiro galego (*Citrus aurantifolia*). E por fim, a cancrose E, mais conhecida como Mancha bacteriana dos citros, causada pela *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*, que ataca especificamente porta-enxertos de citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata*), e é restrita a Flórida (SWINGS e CIVEROLO, 1993; BEHLAU, 2006; SCHAAD et al., 2005).

2.3 Doença

A bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é de fácil disseminação, tendo os fenômenos naturais (chuva e vento) e o homem (transito de pessoas, equipamentos, material biológico e veículos) seus principais disseminadores. É altamente resistente, consegue sobreviver por vários anos em material vegetal cítrico contaminado como folhas, frutos e ramos secos (FUNDECITRUS, 2009d). Ocorre principalmente em regiões com alta umidade (chuvas abundantes), altas temperaturas (entre 20°C e 35°C) e ataca a planta especialmente durante o período de crescimento dos frutos e folhas (GOTTWALD e GRAHAM, 2000; WEELS et al., 1987).

No processo de contaminação, após uma fase epífita, onde a bactéria coloniza a superfície da planta cítrica hospedeira sem causar a doença, inicia-se o processo de infecção, cujo primeiro passo é a penetração na planta por qualquer abertura disponível no vegetal, sendo ela natural (tecidos jovens), tais como estômatos, hidatódios e lenticelas (**Figura 03**), ou por meio de ferimentos nas folhas e frutos, sendo a penetração favorecida pela formação de uma película de água sobre a superfície foliar (BROWN, 2001; GRAHAM et al., 1992). As galerias produzidas pela larva minadora (*Phyllocnistis citrella* Stainton) também são uma excelente porta de entrada para a bactéria e ainda intensifica os danos causados pela doença (BERGAMIM FILHO et al., 2000; GRAVENA, 1998; JESUS JÚNIOR et al., 2006).

Após a entrada da bactéria sua colonização se restringe ao sítio de infecção. Para a sua permanência, sobrevivência nos espaços intercelulares do parênquima vegetal e desencadear o processo infeccioso com sucesso a *X. citri* ativa genes específicos que expressam inúmeras proteínas relacionados a patogenicidade, além de iniciar a produção de polissacarídeos extracelulares como a goma xantana (BROWN, 2001). A diminuição dos espaços intercelulares e o acúmulo de goma resultam em aspecto de encharcamento no tecido infectado, uma vez que ocorre o aprisionamento da água no xilema devido ao potencial higroscópico da goma (PADMANABHAM et al., 1973).

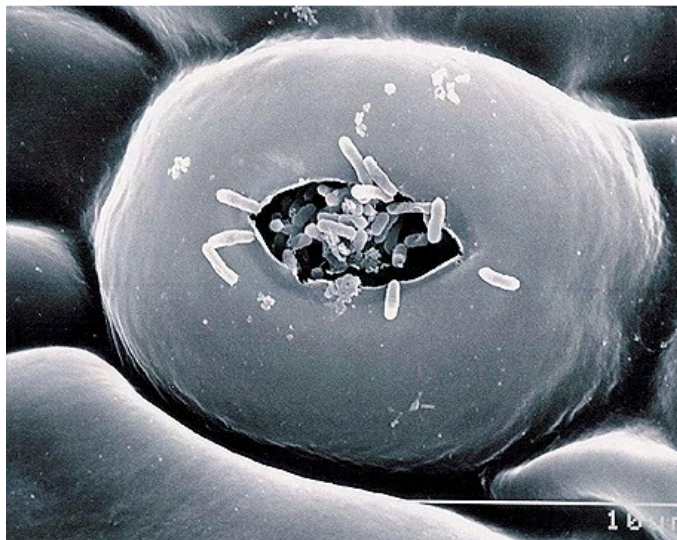


Figura 03: *X. citri* penetrando pelo estômato. Fonte: PLANT MANAGEMENT NETWORK, 2009.

O cancro cítrico acomete folhas, frutos e ramos, e sua sintomatologia básica se resume em lesões corticosas e salientes cor de palha que ocorre devido ao rompimento da epiderme, circundada ou não por um halo de cor amarelada, que podem se manifestar em uma semana a dois meses após a inoculação e atingir de dois até 12 milímetros de diâmetro (AMORIM e FILHO, 1999; ROSSETTI, 2001) conforme pode ser visto na **Figura 04**. A formação deste halo está associada a menor produção de clorofilas a e b, caroteno e xantofila nessas regiões (PADMANABHAM et al., 1973). Nas folhas o aparecimento destas lesões se dá, sobretudo, na superfície abaxial, já que, contem uma maior concentração de estômatos (AMARAL et al., 2003). Contudo, também é muito comum o aparecimento de sintomas na superfície superior da folha. Sintoma este, segundo a FUNDECITRUS (2009d), decisivo para diagnosticar a doença, já que é a única doença conhecida com lesões salientes que aparecem dos dois lados da folha.



Figura 04: Sintomas de cancro cítrico em folhas, frutos e ramos. Fonte: FUNDECITRUS, 2009d.

Ainda, conforme a **Figura 04**, pode-se notar que os tecidos das folhas infectadas também podem apresentar como característica: clorose (amarelecimento), hiperplasia (devido à excessiva divisão mitótica celular) e necrose, características estas, também utilizadas para o diagnóstico da doença (FUNDECITRUS, 2009d; SWARUP et al., 1992). A doença, depois de bem estabelecida no vegetal, provoca destruição de área foliar interferindo no processo de fotossíntese, excessiva produção de etileno em resposta ao estresse biótico provocando a queda prematura de folhas e frutos, aspecto alterado do fruto, seca de ramos novos, e em casos extremamente rigorosos a morte da planta (BROWN, 2001; CROZIER et al., 2001; WEELS et al., 1987).

Com a formação do cancro e ruptura da epiderme, cria-se uma “porta de saída” para grandes quantidades do patógeno, que pode ser levado pelo vento, água ou o próprio homem, rumo a plantas ainda não infectadas, fechando o ciclo. O ciclo completo da doença da Cancrose Asiática pode ser vista na **Figura 05**.

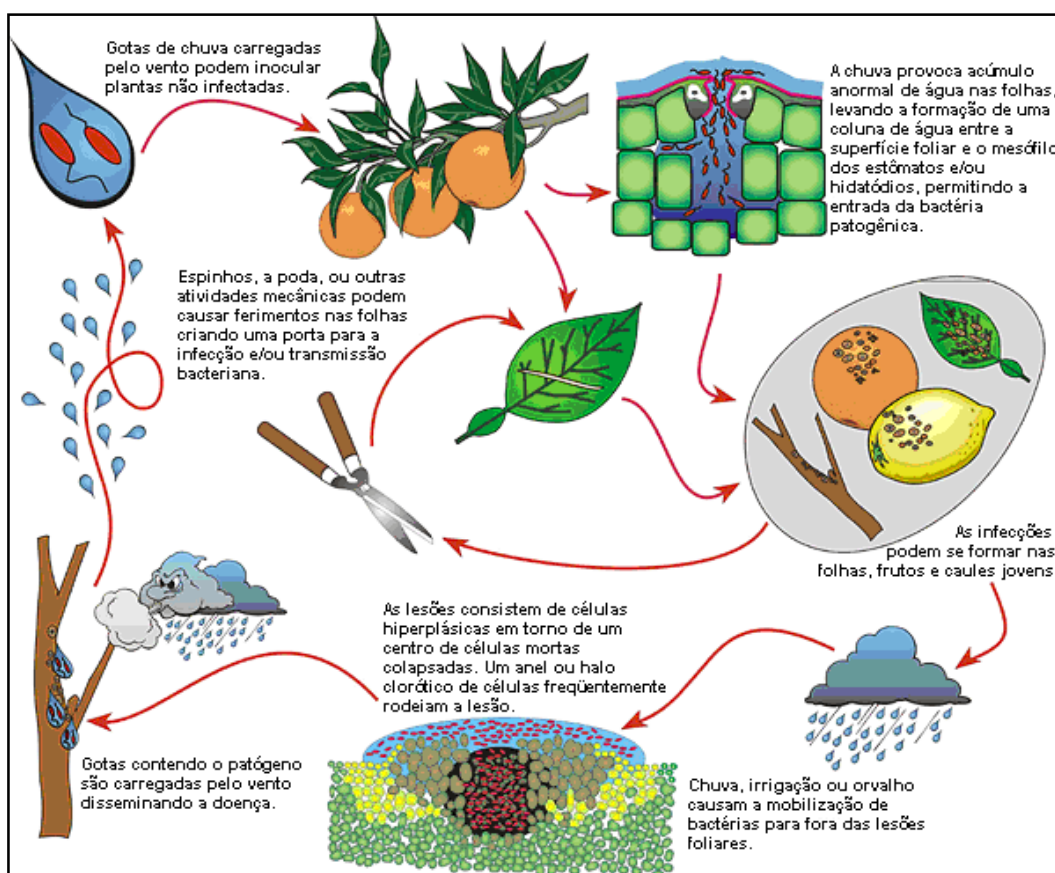


Figura 05: Ciclo do Cancro Cítrico. Fonte: PLANT MANAGEMENT NETWORK, 2009. (Imagem modificada).

2.4 Aspectos moleculares da interação planta-patógeno

As plantas não apresentam um sistema imunológico, capaz de agir em todo o organismo e de analisar rapidamente o invasor e gerar, a partir deste reconhecimento, moléculas específicas a cada molécula estranha, como ocorre entre os animais. Devido esta limitação, todas as células dos vegetais são individualmente capazes de reconhecer patógenos e acionar o sistema de defesa local (HOLT III et al., 2000).

Como primeira medida de defesa, a planta se utiliza de barreiras pré-formadas, como cutícula espessa (HAMMOND-KOSACK e JONES, 2000), ou então processos não específicos, como a deposição de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (CORBIN et al., 1987), lignificação da parede celular (GRAND et al., 1987), ou então a síntese e acúmulo de fitoalexina e/ou proteínas PR, agentes antimicrobianos que inibem a instalação do microorganismo (DIXON et al., 1994; GUSTTINE et al., 1990).

Não obtendo sucesso na tentativa de frear a colonização do patógeno, a planta pode fazer uso de uma segunda estratégia baseada em receptores específicos, desenvolvida no processo de co-evolução entre ela e seus patógenos. Desta forma, ocorre, entre o patógeno e o vegetal, uma competição, onde para cada proteína de ataque produzida pelo patógeno a planta contra-ataca com uma proteína de defesa. Este tipo de interação é conhecida como “Teoria Gene-a-Gene” (FLOR, 1971; STAHL e BISHOP, 2000) e pode ser classificada como compatível, quando o vitorioso desta competição é o patógeno, ou incompatível, quando a ganhadora é a planta.

Na interação compatível o patógeno é capaz de mascarar ou reprimir os mecanismos de defesa da planta hospedeira, desenvolvendo-se nos tecidos vegetais e levando à manifestação de sintomas da doença através de mecanismos de patogenicidade e virulência que envolve a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta atacada, que são capazes de modular, interferir, ou mesmo suprimir as respostas de defesa da planta (WHITE et al, 2000; GACHOMO et al., 2003).

Já na interação incompatível, a planta reconhece o agressor e restringe o patógeno no sítio de infecção. Esta incompatibilidade ocorre quando a planta possui um receptor celular (proteína R codificado pelo gene de resistência) que interage

especificamente com a proteína elicitora (modelo "chave-fechadura"), codificada por genes de avirulência (*Avr*) do patógeno (FLOR, 1971; KEEN, 1990; BUEL, 1999; QUIRINO e BENT, 2003) levando a uma acelerada ativação das vias de transdução de sinais que resultam na resposta de resistência, muitas vezes caracterizada pela Reação de Hipersensibilidade (HR, "Hypersensitivity Response") que nada mais é do que a morte celular programada das células vegetais atacadas pelo patógeno e células adjacentes ao sítio de infecção, provocando o bloqueio e eliminação do agente invasor no local atacado (STASKAWICZ et al., 2001; BERGAMIN FILHO, et al. 1995; GACHOMO et al., 2003). A diferença básica entre a interação compatível e incompatível está relacionada à presença, ausência ou não funcionalidade do gene de resistência na planta ou do gene de avirulência no patógeno.

Estudos demonstraram que alterações na estrutura dos genes de avirulência (*Avr*) podem resultar tanto na perda de patogenicidade/virulência, quanto na geração de novas especificidades, ou seja, novas dinâmicas entre o patógeno e hospedeiro (HERBES et al., 1992; YANG et al., 1994). O maior grupo de genes *Avr* conhecido pertence à família *avrBs3/pth*. O seqüenciamento do genoma de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SILVA et al., 2002) identificou neste fitopatógeno a presença de quatro genes dessa família. Todos estão em plasmídeos e foram denominados de *pthA1*, *pthA2*, *pthA3* e *pthA4* (GABRIEL, 1999).

Os genes *pthA* são necessários para a bactéria *X. citri* induzir sintomas da doença. A inserção destes genes em outras espécies de *Xanthomonas* não patogênicas em citros conferiu a habilidade dessas em romper a epiderme foliar e induzir sintomas em citros (SWARUP et al., 1991). YANG e GABRIEL (1995) observaram que tanto a patogenicidade quanto a virulência são determinados pela região de seqüências repetitivas de 102 pb (pares de base) destes genes. Essas regiões repetitivas são ricas em códon de leucina, sendo possível que funcionem como sítios de ligação para os genes de resistência do hospedeiro. Os genes *pthA*, além de promoverem a divisão (hipertrofia) e o alargamento (hiperplasia) celulares, também estão envolvidos na morte celular programa (DUAN et al., 1999), deixando claro há inter-relação destes genes com o fenômeno da Reação de Hipersensibilidade (HR).

Os eventos fisiológicos associados à HR envolvem um aumento intracelular dos níveis de espécies ativas de oxigênio (O_2^+ e H_2O_2), perda de íons potássio, ganho de íons hidrogênio com conseqüente mudança no pH intracelular, destruição de compartimentos, fortalecimento da parede celular e da cutícula, produção de agentes antimicrobianos (fitoalexinas) e indução da expressão de proteínas de defesa que limitam a colonização do agente invasor, impedindo, desta forma, o estabelecimento da doença (COHN et al., 2001; HAMMOND-KOSAK e JONES, 1996).

Estudos com mutantes de bactérias fitopatogênicas evidenciaram que a HR é modulada por um agrupamento de genes denominado *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”) ou Patogenicidade e Resposta de Hipersensibilidade, para os quais tem se verificado um importante papel, tanto na patogenicidade em plantas suscetíveis, quanto na indução de HR em plantas resistentes (BONAS e VAN DEN ACKERVEKEN, 1997). Primeiramente caracterizado em *Pseudomonas* sp (LINDGREN, 1997), os genes *hrp* também foram identificados nas bactérias fitopatogênicas gram-negativas dos gêneros *Xanthomonas* sp, *Rastonia* sp (SALANOUBAT et al., 2002) e *Erwinia* sp (ALFANO e COLLMER, 1997; VAN GIJSEGEM, 1997).

Os genes *hrp* geralmente são organizados em grandes agrupamentos (Operons) de 19 a 26 genes que, em bactérias fitopatogênicas, estão fisicamente e funcionalmente conservados (BUTTNER e BONAS, 2002a; HUANG et al., 1995; HUTCHESON, 1997; SILVA et al., 2002). Dentro das principais espécies de *Xanthomonas* há uma grande similaridade deste agrupamento, conforme pode ser vista na **Figura 06** (WENGELNIK et al., 1996; SILVA et al., 2002; THIEME et al., 2005), o que indica a sua essencialidade, já que apesar da evolução ocorrida para formação destas diferentes espécies este agrupamento se manteve praticamente intacto.

O mecanismo de ativação de expressão dos genes *hrp* ainda não está totalmente elucidado, no entanto, experimentos utilizando genes repórteres têm demonstrado que os genes *hrp* são ativamente transcrito em planta e em meio mínimo, enquanto que, em meio de cultura rico são expressos em níveis muito baixos (LINDGREN, 1997). Além disso, BADEL et al. (2006) verificaram que a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. tomato é altamente afetada, quanto ao crescimento e formação de lesões em folhas de tomateiro, quando mutada a região gênica onde se localiza o grupo de genes *hrp*.

Foi relatado que os genes *hrp* são controlados por sinais ambientais, tais como osmolaridade, pH e disponibilidade de nutrientes (RAHME et al., 1992). A expressão desses genes ocorre de forma co-regulada e algumas das proteínas codificadas por este agrupamento de genes estão relacionadas com quimiotaxia, transporte de moléculas da planta para a bactéria, síntese e exportação de fatores de avirulência e ainda são responsáveis por codificar vários componentes do sistema de secreção de

tipo III (SSTT) presentes em bactérias patogênicas de plantas e animais (CORNELIS e VAN GIJSGEM, 2000; HUECK, 1998; PETTERSSON et al., 1996).

O SSTT consiste de mais de 20 proteínas, sendo a maioria localizada na membrana interna da bactéria, que juntas formam uma estrutura tubular do tipo “pillus” capaz de conectar a célula bacteriana a animal ou vegetal, permitindo a translocação de vários fatores de patogenicidade e virulência, denominados efetores, para dentro do citosol da célula hospedeira (VAN GIJSEGEM et al., 1993; BAKER et al., 1997; CORNELIS e VAN GIJSEGEM, 2000; CHEN et al., 2004). Muitos dos genes responsáveis pelas suas proteínas possui uma sequência consenso de nucleotídeo (TTCGC...N15...TTCGC), localizada na região promotora, que tem sido caracterizada como elemento que induz a expressão gênica na presença do hospedeiro (FENSELAU E BONAS, 1995; WENGELNIK E BONAS, 1996). Já foi identificado em patógenos bacterianos de animais como *Yersinia* sp, *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderia pseudomallei*, no enteropatógeno *Escherichia coli* e em bactérias simbiotes *Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium fredii* (ALEGRIA et al., 2004; BUTTNER e BONAS, 2002a; BUTTNER e BONAS, 2002b; CORNELIS e VAN GIJSGEM, 2000; HUECK, 1998; PETTERSSON et al., 1996; PLANO et al., 2001).

Além do SSTT, outros agrupamentos de genes que codificam sistemas de secreção de macromoléculas podem ser encontrados em bactérias patogênicas tais como, o sistema de secreção tipo II (SSTD) e o sistema de secreção tipo IV (SSTQ).

O SSTD é amplamente conservado em bactérias gram-negativas e está basicamente envolvido na secreção extracelular de enzimas, geralmente associadas à degradação de tecidos do hospedeiro e na nutrição bacteriana (HACKER e KAPER, 2000). Entre estas enzimas incluem a celulase e pectinase (*Erwinia* sp.); elastase, fosfolipase C e exotoxina A (*Pseudomonas aeruginosa*); amilase e protease (*Aeromonas hydrophyla*); quitinase, protease e toxina da cólera (*Vibrio cholerae*); poligalactouronase (*Xanthomonas campestris*) e pulanase (*Klebsiella oxytoca*) (HACKER e KAPER, 2000; SANDKVIST, 2001; NOUWEN et al., 1999). Em *X. citri* subsp. *citri* e *X. campestris* pv. *campestris* dois SSTD foram identificados: O

agrupamento *xpsEFGHIJKLMN* (*Xanthomonas* protein secretion) composto de 10 genes e *xcsD* (*Xanthomonas citri* protein secretion) (SILVA *et al.*, 2002).

O SSTQ é responsável pela transferência de complexos formados por proteínas e ácidos nucleicos durante a conjugação bacteriana (CHRISTIE e VOGEL, 2000). Em *Agrobacterium tumefaciens* este sistema atua na translocação do T-DNA oncogênico para o interior de células de plantas hospedeiras (CHRISTIE, 1997; GELVIN, 2000). Em outras bactérias pode estar relacionada à secreção de toxinas e outras proteínas como ocorre, por exemplo, em gonococos para a secreção de imunoglobulina A e outras proteases; em *Helicobacter pylori* para a secreção de uma citotoxina e em *Shigella flexneri* e *E. coli* para a secreção das toxinas SepA e EspC, respectivamente (BURNS, 1999; THANASSI e HULTGREN, 2000; PUGSLEY, 1993). Dois agrupamentos codificando componentes da maquinaria do SSTQ foram identificados em *X. citri*, um localizado no cromossomo e outro no plasmídeo (SILVA *et al.*, 2002).

Outro agrupamento de genes que também está diretamente relacionado à interação planta-patógeno é o agrupamento *rpf* (fatores reguladores da patogenicidade), responsável pela produção de proteases, endoglucanases, poligalacturonatolases, polissacarídeos extracelulares (como a goma xantana), entre outros, que influenciam na severidade dos sintomas, agindo sinergisticamente para causar a doença (BARBER *et al.*, 1997; DOW *et al.*, 2000). Este agrupamento é composto por 9 genes (*rpf* ABFCHGDIE) e os únicos organismos conhecidos, até então, que o possuem pertencem ao gênero *Xanthomonas* e *Xylella*. Todos os 9 genes são interdependentes, já que a inserção de um transposon em qualquer um desses genes leva a inibição coordenada da síntese de todas as enzimas e polissacarídeos extracelulares, acarretando na redução da virulência (DOW e DANIELS, 2000).

2.5 O Genoma da *X. citri*

Após 2002, quando foi finalizado o seqüenciamento completo do genoma da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (SILVA *et al.*, 2002), abriu-se a possibilidade de estudos de identificação de genes essenciais ao desenvolvimento do patógeno na

planta, possibilitando, desta forma, identificar genes isolado-específicos no genoma da *X. citri* que poderiam ser responsáveis pela patogenicidade e especificidade deste patógeno em plantas cítricas.

A partir destes estudos o genoma da *X. citri* apontou algumas características particulares, que devem estar relacionadas com a capacidade de adaptação do fitopatógeno ao seu hospedeiro, como presença de um grande número de genes codificadores de enzimas degradativas de parede celular e de transporte de açúcares; de genes putativos codificadores de proteínas efetoras de virulência que estão associadas ao SSTT; genes de biossíntese da goma xantana e de um completo sistema flagelar e de quimiotaxia (MOREIRA et al., 2004).

A análise comparativa, por meio da bioinformática, de dados genômicos bacterianos como seqüências de DNA, perfis de transcriptoma e proteoma geraram informações sobre milhares de genes e proteínas deduzidas. No entanto, grande parte (aproximadamente 40%) destas proteínas deduzidas não possui uma função conhecida ou possui uma função hipotética (LEHOUX et al., 2001).

Na mesma conclusão pode se chegar quando se comparam os genomas das bactérias fitopatogênicas *X. campestris* pv. *campestris*, causadora da podridão negra das crucíferas (brócolis, couve flor, repolho, couve, etc) e *X. citri* subsp. *citri* (SILVA et al., 2002) nas quais dos 4.428 genes presentes em *X. citri* subsp. *citri* (cromossomo e plasmídeos), 800 não são compartilhados pela *X. campestris* pv. *campestris* (18,07%). Destes, apenas 316 (39,5%) possuem função previamente caracterizada, e, portanto, 60,5% dos genes exclusivos de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* ainda são hipotéticos.

Considerando que estes patógenos são altamente específicos quanto ao hospedeiro, pode-se supor que este grande número de genes ainda desconhecidos se deva a genes relacionados à aptidão para a patogênese e a sobrevivência no interior do hospedeiro específico. Por conseguinte, a identificação das funções destes genes gerará subsídios para o entendimento do processo de patogênese, virulência e da interação específica planta-hospedeiro, e para a identificação de possíveis vias de controle da doença.

2.6 Etapa Pós-Genoma da *X. citri*

Transposons ou elementos transponíveis são elementos genéticos que possuem o poder de se translocar aleatoriamente dentro do genoma e conseqüentemente interferindo na regulação e/ou expressão gênica (HAMER et al., 2001). De acordo com FINNEGAN (1989) são seqüências de DNA que podem mudar de posição no genoma, inserindo-se em novos sítios e assim provocando mutações e, conseqüentemente, modificações fenotípicas, de quase imperceptíveis a extremamente severas no organismo mutado.

Com o avanço da Biologia molecular, a técnica de mutagênese ao acaso por inserção de transposon se tornou em uma metodologia capaz de levar à interrupção gênica em larga escala, possibilitando a geração de bibliotecas de mutantes, que, posteriormente, poderiam ser analisadas por meio de mapeamento e localização dos genes mutados. Permitindo, deste modo, como objetivo final, a análise genômica funcional de bactérias patogênicas (LEVANO-GARCIA et al., 2005; HAMER et al., 2001; JUDSON e MEKALANOS, 2000; WONG e MEKALANOS, 2000).

Utilizando-se desta estratégia, um banco de 10.000 clones mutantes de *X. citri* foi obtido por meio de transformação de células eletro-competentes com o complexo transposase/transposon EZ-TN5TM <KAN-2> Insertion (EPICENTRE, 2009; GORYSHIN et al., 2000). Destes, cerca de 3.300 foram inoculados em planta hospedeira e 100 apresentaram patogenicidade alterada em comparação a *X. citri* selvagem.

O estudo integrado, associando os genes mutados, os respectivos fenótipos apresentados por estes mutantes, as vias de expressão gênica e os metabólicos relacionados a estes genes pode levar a uma maior compreensão do processo infeccioso em seus diferentes estágios, além de identificar possíveis alvos para o controle da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições de Cultivo e Armazenamento.

Neste estudo foi utilizada a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* isolado 306, que teve o seu genoma completamente seqüenciado, bem como mutantes deste isolado obtidos por inserção aleatória do transposon Tn5, a partir do kit de inserção EZ-TN5TM <KAN-2> (Epicentre®).

As bactérias usadas neste trabalho foram cultivadas em meio TS líquido (triptona 10g/L, sacarose 10g/L, glutamato de sódio 1g/L) a 28°C e 180 rpm, ou em TS sólido, neste caso com acréscimo de Agar 15g/L, a 28°C. No caso do crescimento de mutantes, o meio de cultura foi suplementado com o antibiótico de seleção canamicina, a uma concentração de 100µg/mL em meio sólido e 50µg/mL em meio líquido. A suplementação com antibiótico foi realizada sempre após o processo de esterilização por autoclave e já com o meio resfriado, para que o antibiótico não fosse desnaturado e perdesse sua propriedade seletiva.

As placas de Petri utilizadas vieram estéreis de fábrica. O meio de cultura e todos os outros instrumentos e materiais utilizados para manusear as bactérias, foram autoclavados a 120°C por 20 min.

A estocagem da bactéria *X. citri* 306 selvagem foi feita em meio PSA (nitrato de cálcio 0,5g/L, sulfato ferroso 0,5g/L, fosfato de sódio dibásico 2g/L, peptona 5g/L, sacarose 20g/L, agar 20g/L e ajustado o pH para 6,6 a 6,8) à temperatura ambiente. Este meio tem a propriedade de manter viável culturas de *Xanthomonas sp.* por vários meses.

Para os mutantes foi construído um “micro-estoque” a partir do estoque geral do laboratório (**Figura 07**). Para a montagem deste estoque cada um dos 53 mutantes foram semeados, de forma independente, em placas de Petri contendo meio TS Sólido com canamicina de modo que formassem colônias isoladas. Após 48 h, 3 colônias bem isoladas (Clones A, B e C), de cada um dos mutantes, foram selecionadas e estricadas novamente em placa de Petri, nas condições já mencionadas. Formada massa

bacteriana, uma pequena porção desta foi coletada e transferida para microtubos de 1500 μL , contendo 1000 μL de meio TS-Glicerol 15% (triptona 10g/L, sacarose 10g/L, glutamato de sódio 1g/L e glicerol 150mL/L) contendo o antibiótico de seleção canamicina. O estoque foi mantido em ultrafreezer - 80°C.



Figura 07: Estocagem de clones de mutantes em ultrafreezer, - 80°C.

3.2 Avaliação Fenotípica

Os clones dos mutantes foram individualmente cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido TS com canamicina e incubadas a 28°C. A *X. citri* selvagem, de mesma forma, foi cultivada em placa de Petri contendo TS sólido e incubadas a 28°C, mas sem o antibiótico. Após 48 h foram ressuspensos em solução de MgCl_2 1mM e cada um teve sua concentração celular padronizada em espectrofotômetro para $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,3$ (leitura da Densidade Óptica) correspondente a 10^8 UFC/mL (SHAAD, 2001).

Neste meio tempo as plantas foram transferidas da casa de vegetação para o laboratório de plantas para melhor adaptação ao processo de inoculação.

O próximo passo foi infiltrar por pressão cada suspensão, com o auxílio de uma seringa hipodérmica estéril sem agulha, em um ponto na parte abaxial do mesófilo de uma folha jovem de *Citrus sinensis* (Laranjeira pêra-rio) e *Citrus limonia* (limoeiro cravo) suscetível à doença. Foi adotado que na parte abaxial esquerda da folha inocular-se-ia a *X. citri* mutante, e na parte direita a *X. citri* selvagem (controle positivo), e assim excluir uma possível variação da fisiologia foliar existente entre uma planta e outra. A avaliação dos sintomas foi realizada ao longo de 16 dias, mais precisamente no 4º, 8º, 12º e 16º dias após a inoculação, onde as folhas inoculadas foram registradas por meio de imagens fotográficas digitais com a câmera Sony DSC-S75/S85 de 4,1 mega pixels.

As inoculações foram executadas em nosso laboratório de segurança (nível II), concebido especialmente para a manipulação e inoculação de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em plantas hospedeiras, localizado nas dependências do Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular (UNESP- Jaboticabal), sob condições controladas de umidade, temperatura (28°C) e luminosidade (Fotoperíodo) e máxima segurança oferecido pela pressão negativa e equipamentos que filtram constantemente o ar contido no laboratório antes de ser liberado para o meio ambiente (**Anexo A**).

3.3 Seqüenciamento

Para a realização do seqüenciamento dos mutantes foi preciso, respectivamente, a extração do DNA total do mutante; a clivagem deste material e do vetor pBS KII com uma mesma enzima de restrição; a reação de ligação entre os fragmentos de DNA com o vetor; a inserção destes vetores modificados (vetor + fragmento) dentro de células de *E. coli*; a seleção de colônias de *E. coli* que receberam apenas o vetor contendo o fragmento de DNA contendo o transposon; a multiplicação de uma destas colônias; a extração do plasmídeo; e enfim o seqüenciamento propriamente dito.

3.3.1 Extração de DNA genômico total

Os mutantes foram cultivados em placas de 96 cavidades contendo 1 mL de meio de cultura TS liquido (10g/L de triptona, 10g/L de sacarose, 1g/L de glutamato de sódio) com 50µg/mL de canamicina, por 48 h a 28°C sob agitação de 200 rpm. Após este período as placas foram submetidas à centrifugação por 30 min a 4.000 rpm, a temperatura ambiente.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensionado por meio de forte agitação em 500 µL de tampão de lavagem (Tris-HCl 10mM pH 8,8 ; KCl 3mM; NaCl 1,25mM) preparado imediatamente antes do uso, e a placa submetida a centrifugação por 15 min a 4.000 rpm, a temperatura ambiente. Repetiu-se o passo anterior por mais uma vez e, novamente, o sobrenadante descartado, o precipitado ressuspensionado por meio de forte agitação, agora, em 500 µL de tampão D (Citrato de sódio 25mM pH 7,0; sarcosil 0,5% e isotiocianato de guanidiana 4M) e incubados em banho-maria a 65°C por 1 h. Decorrido este período de lise celular, 210 µL do tampão P (Tris-HCl 667mM pH 7,5; NaCl 833mM e EDTA 83mM pH 8,0) foram adicionados às cavidades das placas, que em seguida, foram agitadas e centrifugadas por 30 min a 4000 rpm, a temperatura ambiente.

Realizada as fases de lavagem e lise celular, 550 µL do sobrenadante, de cada uma das cavidades, foi transferida para uma nova placa e em seguida submetida à centrifugação por 15 min a 4000 rpm, a temperatura ambiente. Após este procedimento,

novamente 150 µL de cada sobrenadante foi transferido para novas placas de 96 cavidades do tipo Elisa, sempre evitando transferir o precipitado.

A fim de isolar o DNA da solução, 130 µL de isopropanol, a -20°C, foi adicionado a cada amostra e estas incubadas a -80°C por 15 min ou então a -20°C por 12 h. Transcorrido este período, as placas foram submetidas à centrifugação por 45 min a 4000 rpm, a 4°C, e o precipitado lavado com 200 µL de etanol 70% por duas vezes, com centrifugações por 20 min a 4000 rpm, a 4°C, após cada lavagem.

Finalmente os precipitados foram secos, sob vácuo, ressuspensos em 40 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 0,1mM pH 8,0) contendo RNase A 1µg/mL e incubados por 1 h a 37°C. A qualidade e a concentração dos DNAs foram avaliadas em gel de agarose 0,8% por meio de comparação com um padrão comercial de tamanho de DNA. Todas as centrifugações utilizaram a centrífuga Rotanta 46R do fabricante Hettich, Alemanha.

3.3.2 Clivagem e Reação de Ligação

O DNA genômico dos mutantes foram clivados tomando o cuidado para se escolher enzimas de restrição que não cortassem o transposon e que possuísem um único sítio de restrição dentro da região de clonagem do plasmídeo pBlueScript II SK (pBS KII). Desta forma, entre as possibilidades, foram escolhidas as enzimas *EcoRI*, *SacI* ou *SacII*.

A reação de clivagem do DNA do vetor pBS KII consistiu de 8 µL de água bi-destilada estéril; 2,5 µL do tampão 10x que acompanha a enzima; 2,5 µL de BSA 10mg/µL; 10U de enzima de restrição e 10 µL de DNA do vetor. A reação de clivagem do DNA genômico total, por sua vez, consistiu de uma solução de 12,7 µL de água bi-destilada estéril; 2 µL de tampão 10x que acompanha a enzima; 2 µL de BSA 10mg/µL; 5U da mesma enzima utilizada na clivagem do vetor e 3 µL de DNA total. Quando a enzima utilizada não requeria BSA, este foi substituído por água bi-destilada estéril. Em ambos os casos, as reações (vetor e DNA genômico) foram mantidas a 37 °C por 12 h. Desta maneira, da 1ª reação se formou milhares de fitas únicas e idênticas do vetor

pBS KII, enquanto que a 2ª reação produziu diversos fragmentos diferentes de DNA genômico, nas quais muitos deles continham o transposon.

A reação de ligação entre os fragmentos do DNA genômico e o vetor pBS KII foi realizada em tubos de microcentrífuga de 500 µL, utilizando 3,5 µL de água bi-destilada estéril; 0,5 µL de enzima T4 DNA ligase; 1 µL de tampão 10x que acompanha a enzima; 2 µL do produto da clivagem do DNA total e 3 µL do produto da clivagem do vetor. A reação foi mantida a 16°C por 12 h.

3.3.3 Preparo de Células Eletro-competentes

Obtido os plasmídeos recombinantes, estes foram utilizados para transformar a bactéria *Escherichia coli* (inserção do plasmídeo dentro da bactéria). Entretanto para a realização dessas transformações, foi necessário preparar a *E. coli* para que estivessem eletro-competentes, ou seja, após um processo físico (descarga de alta tensão) se tornassem capazes de receber o plasmídeo com facilidade.

Neste processo, a bactéria *Escherichia coli* linhagem DH10B foi semeada numa placa contendo meio LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar 15g/L, e ajustado o pH para 7,0), incubada a 37°C por 12 h e então, uma colônia isolada desta placa foi coletada e multiplicada em 50 ml de meio 2xTY (Tryptona 16 g/L, extrato de levedura 10 g/L, NaCl 5 g/L e ajustado o pH para 7,4) por mais 12 h, a 37°C, sob agitação constante de 250 rpm. Transcorrido este intervalo, uma fração desta solução foi adicionada em 500 ml de 2xTY, ainda estéril, para que obtivesse uma $DO_{600nm} = 0,1$. Esta nova solução foi deixada a 37°C a 250 rpm até atingir a $DO_{600nm} \approx 0,6$ (entre 0,5 a 0,7) quando então foi colocada em contato com gelo por 20 min para interromper seu processo de multiplicação.

A solução, então, foi centrifugada por 15 min a 6.000 rpm, a 4°C e o sobrenadante descartado. Realizada esta etapa foram feitas lavagens sucessivas das células, para a concentração e remoção do meio de cultura, com quantidades cada vez menores de uma solução gelada de glicerol a 10% em água (200 mL, 20 mL e 1 mL). Após a lavagem com 200 mL e 20 mL a solução foi centrifugada por 15 min a 6.000

rpm, a 4°C. O volume final (1 mL de células eletro-competentes concentradas) foram aliquotados em tubos, de forma que cada um contivesse 40 µL. Por fim cada um destes tubos foram mergulhados em nitrogênio líquido e em seguida estocadas a -80°C em ultrafreezer.

3.3.4 Transformação de *E. coli*

A transformação de *Escherichia coli* foi realizada conforme descrito por SAMBROOK (1989) com modificações.

A primeira das etapas foi o processo de eletroporação, na qual uma solução contendo 10 µL da reação de ligação e 40 µL de células eletro-competentes foi introduzida dentro de uma cubeta de 0,1 cm, de modo que a solução tocasse seus dois lados metálicos para que houvesse a passagem de corrente, e submetidos ao Eletroporador Gene Pulser II (BioRad) sob as seguintes condições: 1,8 kV de pulso elétrico, 25 µF Low cap, 400 Low range de frequência e “high range” mantida no infinito.

Esta solução, então, foi transferida para um tubo de 1500 µL, onde foi adicionado também 980 µL meio SOB (triptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10mM, KCl 25mM), 10 µL solução Mg⁺⁺ (MgCl₂ 1M e MgSO₄ 1M) e 10 µL de solução de glicose 2M. Este tubo foi mantido a 37°C sob agitação constante a 200 rpm por 1 h, e com isso provocar o favorecimento de uma maior expressão da marca de seleção nas células de *E. coli* transformadas.

Neste meio tempo foi preparada uma placa de Petri contendo meio de cultura LB (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L, agar 15g/L, ajustar pH para 7,0) acrescido de canamicina 100µg/mL, onde foi posteriormente espalhado sobre sua superfície 40 µL de X-gal (40mg/mL) e 40 µL de IPTG (100mM).

Decorrido o intervalo de 1 h, 200 µL da solução foi semeada na placa de Petri (meio LB + canamicina + X-gal + IPTG) anteriormente preparada e mantida a 37°C por 12 h, de modo a obter colônias isoladas. Teoricamente seria possível verificar colônias azuis e brancas. A presença de colônias brancas indicaria sucesso no procedimento, ou seja, indicaria que ali estão presentes bactérias que receberam o plasmídeo com o

fragmento genômico contendo o transposon. Caso contrário, quando não foi possível observar colônias Brancas, novamente proceder-se-ia à clivagem do DNA genômico do mutante e vetor com outra combinação de enzimas de restrição, repetindo-se o processo.

3.3.5 Extração de DNA plasmidial

Obtido sucesso no processo de transformação, uma colônia branca de cada mutante foi selecionada, crescida em 3 mL de LB líquido (triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L e ajustar pH para 7,0) em tubos de 1500 µL (2 tubos), acrescido de 50µg/mL de canamicina, agitado por 24 h a 200 rpm a 37°C e, então centrifugados. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensionado em 200 µL da solução I (Tris-HCl 25mM pH 8,0; EDTA 10mM e D-glicose 50mM) a 4°C, agitado até a sua completa solubilização, e então mantida em repouso por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, adicionado 200 µL da solução II (NaOH 0,2N e SDS 1%) preparados pouco antes do uso, agitada por inversão de tubos, mantida no gelo por 5 min, e então, adicionado mais 150 µL da solução III (acetato de potássio 3M, ácido acético 2M) e novamente gentilmente misturada e mantida no gelo por 5 min.

Adicionado as três soluções, a amostra foi submetida à centrifugação, e em seguida 500 µL do seu sobrenadante transferida para um novo tubo, evitando a transferência do precipitado. Neste tubo adicionou-se 500 µL de uma mistura fenol/clorofórmio (1:1), foi agitado, por inversão de tubos, durante 2 min e, então, centrifugada. A fase aquosa ($\approx$ 450 µL), então, foi transferida para um novo tubo, adicionado o mesmo volume de clorofórmio e novamente centrifugado. A fase aquosa ($\approx$ 400 µL), mais uma vez, foi transferida para um novo tubo, para, enfim, o DNA plasmidial ser precipitado pela adição de 700 µL de etanol absoluto (temperatura ambiente). As amostras foram gentilmente misturadas e mantidas a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA foi lavado e centrifugado, por duas vezes, com 1 mL de etanol 70%,

secado sob vácuo e ressuspendido em 30 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 0,1mM pH 8,0) contendo RNase A 1µg/mL e incubados por 1 h a 37°C.

A qualidade e a concentração dos DNAs foram avaliadas em gel de agarose 0,8% por meio de comparação com um padrão comercial de tamanho de DNA. Todas as centrifugações foram realizadas em temperatura ambiente por 5min e a 14.000 rpm na centrífuga Eppendorf modelo 5415C.

3.3.6 PCR e Seqüenciamento do gene mutado

As reações de seqüenciamento foram realizadas segundo o método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (SANGER et al., 1977), utilizando a química do “BigDye Terminator” da Applied Biosystems (ABI), por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

Para a reação de PCR foi utilizada 2 µL de DNA plasmidial; 1 µL do oligonucleotídeo iniciador Forward KAN-2 FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') ou do oligonucleotídeo iniciador Reverse KAN-2 RP-1 (5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG-3'); 2 µL de tampão de seqüenciamento; 2 µL do corante “BigDye” versão 3.0 e 3 µL de água bi-destilada estéril. Os ciclos utilizados foram: uma fase inicial de desnaturação a 96°C por 2 min, seguidos de 35 ciclos composto de uma etapa a 96°C por 10 s (desnaturação), uma etapa a 52°C por 5 s (pareamento) e uma etapa a 60°C por 4 min (polimerização) e uma fase final de polimerização a 60°C por 10 min. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso, quando então foram lavadas.

No processo de lavagem, em cada uma das amostras, foi adicionado 80 µL de isopropanol, deixada em repouso, à temperatura ambiente, por 15 min, centrifugada por 45 min a 4.000 rpm a 20°C e o sobrenadante descartado. O precipitado de DNA foi lavado em 200 µL de etanol 70%, centrifugado por 15 min a 4.000 rpm a 20°C por duas vezes e então seco a vácuo. Como procedimento final, cada amostra recebeu 10 µL de formamida deionizada, foi mantida por 5 min a 95°C em termociclador, resfriada por 2

min em gelo e, enfim, submetida ao seqüenciamento no seqüenciador automático ABI PRISM 3700 DNA Analyzer, da Perkin Elmer.

Foram feitas duas reações de seqüenciamento para cada um dos mutantes, de modo que fossem seqüenciadas pelos 2 oligonucleotídeos iniciadores (Forward e Reverse) independentemente. Os oligonucleotídeos iniciadores KAN-2 possuem sítios de pareamento nas extremidades do transposon e direcionam a síntese no sentido externo a este. Por este motivo, no final do processo, obtém-se o seqüenciamento do transposon e das duas extremidades de DNA que o flanqueiam (**Figura 08**). Através de ferramentas de Bioinformática removeu-se o transposon e alinharam-se as seqüências genômicas, que foram então submetidas ao banco de dados do projeto Genoma da *X. citri* 306 para identificação e validação do gene mutado. Todo este processo de alinhamento, comparação e validação foram realizadas por meio do algoritmo BLASTn e BLASTx (ALTSCHUL, 1997).

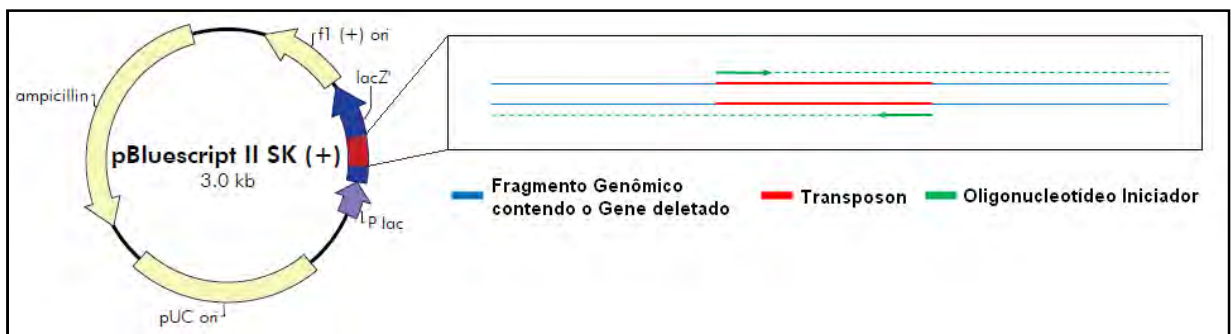


Figura 08: Esquema mostrando o plasmídeo e como os oligonucleotídeos iniciadores executam sua função no seqüenciamento.

3.4 Análise fitopatológica

3.4.1 Curva de crescimento *in vitro*

Com a finalidade de avaliar o desenvolvimento da *X citri* selvagem e das *X. citri* mutantes em um meio não natural e buscar por novos esclarecimentos a respeito dos genes mutados foram feitas algumas curvas de crescimento *in vitro*, já que uma proteína pode ser de vital importância quando dentro de seu hospedeiro natural, na qual a bactéria está sobre pressão de uma série de mecanismos de defesas da planta e/ou ativando seus próprios mecanismos de ataque, e ser completamente dispensável em meio artificial.

A curva *in vitro* (**Anexo B**) se inicia com a multiplicação da bactéria em placa de Petri com TS sólido (contendo canamicina no caso dos mutantes, e sem antibiótico no caso da bactéria selvagem) e incubada a 28°C por dois a três dias. Após o desenvolvimento de massa bacteriana, uma pequena porção foi transferida para um tubo de 15 mL contendo 5 mL de meio TS líquido e deixadas por 24 a 28 h (28°C, 180 rpm). Após este período, todo o conteúdo deste pré-inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio TS líquido estéril, sendo, portanto, este um segundo pré-inóculo, que voltou para a incubadora de crescimento (28°C, 180 rpm) por mais 12 h.

Passada às 12 h, e a fim de se adotar um padrão para que todos os inóculos tivessem aproximadamente o mesmo número de células no início das curvas de crescimento, 1 mL deste segundo pré-inóculo foi diluído com meio TS líquido estéril, e teve sua concentração celular padronizada em espectrofotômetro para $DO_{600nm} = 0,7$. 1 mL desta solução foi, então, transferida para um novo erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio TS líquido estéril, homogeneizada e obtido, por meio do espectrofotômetro (DO_{600nm}) o primeiro ponto da curva (T_0).

Em seguida, o erlenmeyer foi transportado para a incubadora de crescimento (28°C, 180 rpm) e após 8 h coletado o segundo ponto da curva (T_8), momento este em que a bactéria está saindo da fase Lag e entrando em Log. A partir de então os pontos foram coletados de 4 em 4 h até completar 32 h.

O resultado da elaboração da curva de crescimento *in vitro* foi expresso em um gráfico de Linha onde a Densidade Óptica (DO_{600nm}) compõe o eixo Y (ordenada), e as horas após semeio compõe o eixo X (abscissa). Cada ponto das curvas representa a média de 3 repetições independentes realizadas em triplicata, ou seja, cada ponto dos gráficos são o resultados da média de 9 repetições.

A partir da etapa do pré-inóculo, os meios de culturas utilizados para a multiplicação das bactérias não receberam antibiótico, inclusive para a multiplicação dos mutantes. A partir de uma avaliação anterior a curva, percebeu-se que o antibiótico influenciava decididamente no comportamento dos mutantes, e, em contra partida, a sua ausência não implicava em perda de seletividade.

3.4.2 Curva de Crescimento *in vivo*

As curvas de crescimento *in vivo*, ou seja, em planta hospedeira (**Anexo C**), realizadas segundo o método da microcolônia (ROMEIRO, 2001), foram feitas com o intuito de quantificar o grau de comprometimento dos mutantes na capacidade de colonizar a planta cítrica hospedeira, além de poder comparar, em condições naturais de patogenicidade, o perfil destes com a crescimento da *X. citri* selvagem.

As curvas se iniciam com a multiplicação dos mutantes (3 clones) e da *X. citri* selvagem a 28°C por 48 h em placas de Petri com meio TS sólido. Lembrando mais uma vez que, no caso dos mutantes, foi acrescentado antibiótico no meio de cultura. Dentre os 53 mutantes analisados na avaliação fenotípica escolhemos 19. Aqueles cujos sintomas em planta mais se distanciaram daquele observado quando inoculado pela *X. citri* selvagem. Na sequência, foram ressuspensos em solução de MgCl_2 1mM e cada um teve sua concentração celular padronizada em espectrofotômetro para $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,001$ (correspondente a 10^5 UFC/mL, conforme testes preliminares realizados).

Em seguida, cada suspensão foi inoculada (infiltrada por pressão), com o auxílio de uma seringa hipodérmica estéril sem agulha, na parte abaxial do mesófilo de folhas jovens e sadias de *Citrus limonia* (limoeiro cravo) suscetíveis à doença, de modo a preencher uma pequena região da folha, para a retirada de um único disco de 0,75 cm de diâmetro. A inoculação foi feita em um número de folhas suficientes para a realização de todo o experimento, ou seja, aproximadamente 80 folhas por mutante.

Realizada as inoculações, durante 8 pontos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias após a inoculação), foram retirados, com um furador de 0,75cm de diâmetro, 9 discos foliares de cada mutante (3 para cada clone) e da *X. citri* selvagem. Os discos foliares foram desinfetados em álcool 70% por 30 s e em seguida mergulhados em água, durante o mesmo tempo. Cada disco foi, então, macerado em um tubo de 1.500 μL contendo 1 ml de solução MgCl_2 1mM estéril e em seguida procedida a diluição seriada com fator 1:10 (10^{-1} a 10^{-8}) em solução salina (0,85% de NaCl e 0,5% de Tween 80). 10 μL de cada diluição foi gotejado em meio TS sólido (contendo canamicina para os *X. citri* mutantes, e sem antibiótico no caso da *X. citri* selvagem) de forma a obter microgotas enfileiradas

conforme o método de microcolônia (ROMEIRO, 2001). O Tween 80 presente na solução salina possibilita uma maior dispersão das colônias nas microgotas em placa, facilitando assim a sua contagem (ROMEIRO, 2001).

Cerca de 36 h após a incubação, a 28°C, as colônias foram contadas e expressas em UFC/cm² da área foliar inoculada e os dados plotados em gráficos, onde a Log¹⁰ UFC/cm² compõe o eixo Y (ordenada) e os dias após a inoculação representam à eixo X (abscissa). Cada mutante foi plotado em um gráfico separadamente, sempre na presença da curva da *X. citri* selvagem, já que esta é nosso parâmetro de comparação, uma vez que executa o programa de patogenicidade e virulência com perfeição, ou seja, favorece a colonização e multiplicação nos espaços intercelulares do tecido vegetal infectado, induzindo sintomas típicos de cancro cítrico no hospedeiro.

Para a realização das curvas foi preciso a mobilização de uma grande quantidade de material vegetal e de laboratório: 1600 folhas ou 320 mudas de limão cravo para inoculação (80 folhas ou 16 mudas por mutante); 480 placas de Petri; entre 8 e 9 litros de meio de cultura, 2 litros de solução MgCl₂ 1mM estéril para a maceração, 6 litros de solução salina (0,85% de NaCl e 0,5% de Tween 80) para a diluição; em torno de 9.000 tubos de microcentrifuga (1500 ul e 750 ul) e 12.000 unidades de ponteiros de pipetadores automáticos (1000 ul e 200 ul).

O tempo, o espaço físico e a quantidade de equipamentos também foram fatores limitantes. Somente o procedimento de obtenção de um ponto de uma única curva (a retirada dos discos foliares, a maceração, a diluição e o gotejamento em placa), levava cerca de 1 h. Desta forma, as curvas não puderam ser feitas todas de uma única vez sendo feitas pouco a pouco.

Cabe aqui salientar que, como nas curvas de crescimento *in vitro*, cada um de seus pontos também representam a média de 3 repetições independentes realizadas em triplicata, ou seja, cada ponto dos gráficos são o resultados da média de 9 repetições.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seqüenciamento

Dos 53 mutantes analisados neste trabalho foi possível determinar, por seqüenciamento, o gene nocauteado de 49 deles. Pode-se verificar pela **Tabela 1** que nenhum gene se repete, além de indicar genes localizados de forma dispersa e homogênea dentro do genoma da *X. citri* 306, indicando que a estratégia, de obtenção de mutantes por meio do complexo transposase/transposon EZ-TN5TM <KAN-2> Insertion mostrou possuir boa randomicidade dentro do genoma bacteriano. Em relação ao rol de proteínas identificadas, pode-se observar que muitas delas não eram citadas, até então, como relacionadas ao processo patogênico, o que permitira em um maior entendimento das vias metabólicas envolvidas neste processo. Além disso, este rol também revela que muitas destas proteínas são hipotéticas, ou seja, proteínas cuja função ainda não foram descritas na literatura, sugerindo que muitas delas sejam exclusivas de *Xanthomonas* sp. Provavelmente, tais proteínas estejam relacionadas com a interação específica patógeno-hospedeiro, o que as torna alvos para a produção de drogas no controle da bactéria.

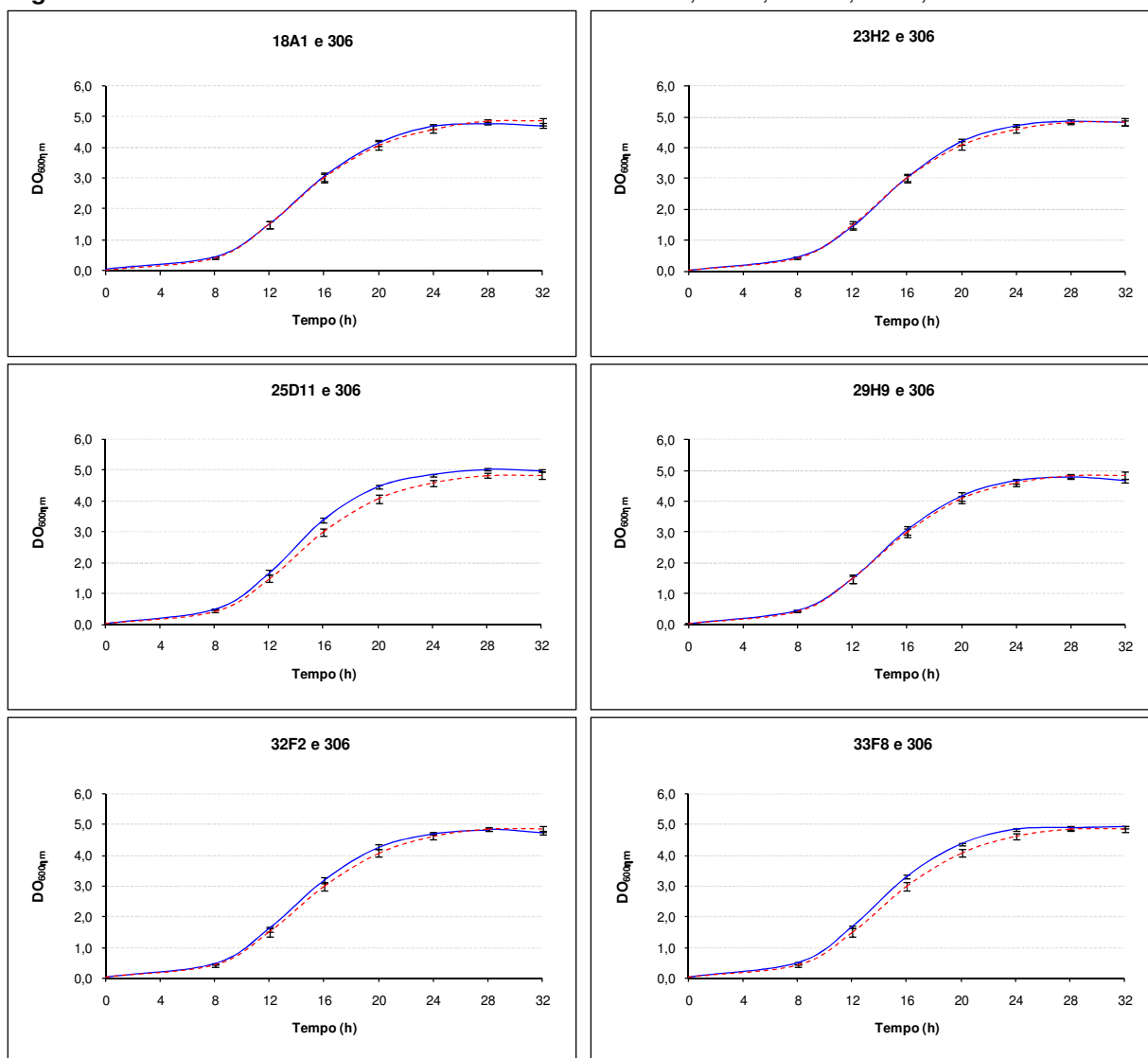
Tabela 01 - Relação dos genes seqüenciados.

MUTANTES	NCBI - GeneID	Gene Nocauteado	Proteína Codificada	Categoria
32B11	1154128	Xac 0057	Proteína de transporte (hetA)	Transporte Trans-membrana
32F6	1154130	Xac 0059	Proteína semelhante a Asparagina sintetase (asn)	Biossíntese de Aminoácidos
29G9	1154139	Xac 0068	-	Proteína Hipotética
21C12	1154146	Xac 0075	Proteína semelhante a repressor de xilose (xylR)	Metabolismo Intermediário
25D8	1154330	Xac 0259	-	Proteína Hipotética conservada
33E7	1154407	Xac 0336	5-metiltetrahydropterotrilglutamato-homocisteína metiltransferase (metE)	Biossíntese de Aminoácidos
29H4	1154740	Xac 0669	Protease específica para cauda (prc)	Endereçamento de Proteína
33E4	1154797	Xac 0726	Hidrolase metil paration (mpd)	Processos Celulares
28C4	1154803	Xac 0732	-	Proteína Hipotética
27E10	1154924	Xac 0853	-	Proteína Hipotética
32F2	1154974	Xac 0903	Regulador de nucleosídeo difosfato quinase (rnK)	Biossíntese de Fatores de Transcrição
30G1	1155076	Xac 1005	Peptidil-prolil cis-trans isomerase (ppiB)	Tradução e Modificação
29G5	1155079	Xac 1008	-	Proteína Hipotética Conservada
33D9	1155100	Xac 1029	Folilpoliglutamato sintase / Diidrofolato sintase (folC)	Metabolismo de Cofatores e Vitaminas
32D3	1155178	Xac 1107	Integrase	Processos Celulares
28A12	1155182	Xac 1111	Proteína de recombinação RecR (recR)	Replicação e Reparação Genética
22A11	1155260	Xac 1189	Ferredoxina	Processos Celulares
23D6	1155327	Xac 1256	Proteína de tolerância a penicilina (LytB)	Biossíntese de Metabólicos Secundários
33F8	1155329	Xac 1258	Citocromo O ubiquinol oxidase Subunidade II (cyoA)	Fosforilação Oxidativa
30F6	1155562	Xac 1491	-	Proteína Hipotética
21B10	1155602	Xac 1531	-	Proteína Hipotética
28B8	1155645	Xac 1574	Proteína transportadora fosfato ABC ATP Obrigatório (pstB)	Transporte Trans-membrana
29C11	1155736	Xac 1665	-	Proteína Hipotética Conservada
31B11	1155791	Xac 1720	Proteína de Divisão Celular FtsB (ftsB)	Divisão Celular
30A8	1155793	Xac 1722	2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase (lspF)	Biossíntese de Metabólicos Secundários
25D11	1155998	Xac 1927	Fe-S oxidoreductase (aslB)	Metabolismo Energético
32F10	1156305	Xac 2234	Transportador MFS (cynX)	Transportadores de Ácidos Orgânicos
23B12	1156314	Xac 2243	Proteína Relacionada ao Plasmídeo (orf8)	Processos Celulares
29C8	1156336	Xac 2265	DNA Helicase IV (helD)	Recombinação e reparação do DNA
29B5	1156415	Xac 2344	-	Proteína Hipotética Conservada
29H10	1156484	Xac 2413	Ribonuclease D (rnd)	Tradução / Metabolismo de RNA
25G7	1156528	Xac 2457	Oxidoreductase ubiquinol citocromica, Subunidade Ferro-enxofre (petA)	Fosforilação Oxidativa
23H1	1156649	Xac 2578	Proteína GumI (gumI)	Patogenicidade, Virulência e Adaptação
31E12	1156834	Xac 2763	Protease Extracelular	Metabolismo de Macromoléculas
26F10	1157128	Xac 3057	Beta-lactamase (bla)	Biossíntese de Metabólicos Secundários
22E9	1157251	Xac 3180	Transportador de Ferro (iucA)	Processos Celulares
34G10	1157282	Xac 3211	Treose 6-fosfato sintase (ostA)	Metabolismo do Amido e Sacarose
29H9	1157349	Xac 3278	-	Proteína Hipotética
23H2	1157382	Xac 3311	Receptor Dependente de Ton-B (iroN)	Processos Celulares
34H11	1157439	Xac 3368	-	Proteína Hipotética conservada
28B9	1157496	Xac 3425	Citocromo C6	Processos Celulares
34C2	1157496	Xac 3444	Receptor Dependente de Ton-B (btuB)	Transporte Trans-membrana
25H9	1157610	Xac 3539	Proteína J da via geral de secreção (xpsJ)	Transporte Trans-membrana
23A8	1157848	Xac 3777	-	Proteína Hipotética conservada
26E1	1157886	Xac 3815	-	Proteína Hipotética conservada
18A1	1157977	Xac 3906	Proteína de divisão cromossômica (parB)	Divisão Celular
30A10	1158052	Xac 3981	-	Proteína Hipotética conservada
23G12	1158058	Xac 3987	Leucina aminopeptidase	Metabolismo da Glutamina
25H2	1158392	Xac 4321	-	Proteína Hipotética

4.2 Curva de crescimento *in vitro*

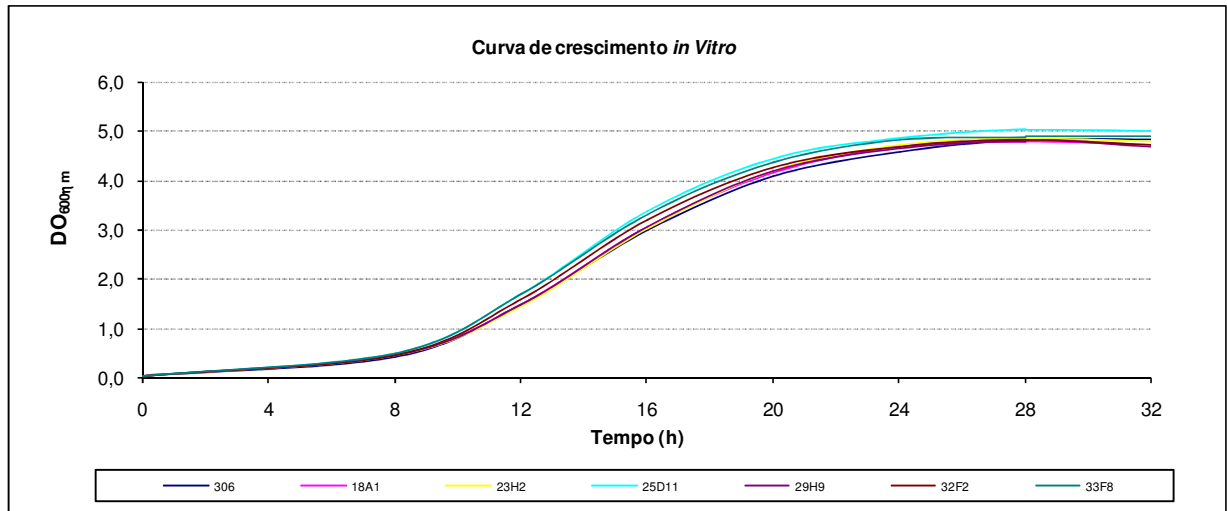
Foram realizadas 7 curvas de crescimento *in vitro*, sendo 6 de mutantes e uma da *X. citri* selvagem. Optamos por comparar cada mutante com a selvagem de forma isolada (**Figura 09**) e também plotar todas as 7 curvas juntas em um único gráfico (**Figura 10**).

Figura 09 - Curvas de crescimento *in vitro* dos mutantes 18A1, 23H2, 25D11, 29H9, 32F2 e 33F8.



A linha continua refere-se a *X. citri* mutante e a linha tracejada a *X. citri* selvagem.

Figura 10 - Curva de crescimento *in vitro* integrando os mutantes 18A1, 23H2, 25D11, 29H9, 32F2 e 33F8.



Todos os mutantes analisados pelas curvas de crescimento *in vitro* se comportaram de forma idêntica a *X. citri* selvagem, como pode ser visto pelas **Figuras 09 e 10**. Este resultado é o oposto do encontrado nas curvas de crescimento *in vivo*, onde estes mesmos mutantes se comportaram bem diferentes da selvagem e também apresentaram grandes diferenças entre si. O mutante 18A1, por exemplo, manteve seu número estagnado durante toda a curva de crescimento *in planta*, enquanto o mutante 32F2 multiplicou-se muito bem quando inoculado em planta.

Os resultados apresentados pelas curvas de crescimento *in vitro* provavelmente seja fruto da capacidade do meio TS em suprir as deficiências de cada mutante, já que todos os mutantes apresentaram os mesmos resultados. Mas também existe a possibilidade de que os genes de alguns mutantes escolhidos para este experimento tenham funções exclusivamente envolvidas no processo patogênico, e por isso não teriam função em meio artificial, o que explicaria o porquê das semelhanças entre estes mutantes e a *X. citri* selvagem.

4.3 Avaliações Fenotípicas e Curvas de Crescimento *in vivo*.

Para facilitar a comparação e conseqüentemente tornando a avaliação mais rápida optamos por apresentar as avaliações fenotípicas e as curvas de crescimento *in vivo* de forma conjunta e associando a estes dados também alguma informação bioquímica conhecida a respeito do gene deletado.

Os mutantes foram divididos em grupos de acordo com os resultados obtidos pela avaliação fenotípica. Para cada grupo foi confeccionada uma tabela exibindo seus fenótipos mais básicos: hiperplasia (Hip) e necrose (Nec). Desta forma, cada mutante poderia se comportar como a *X. citri* selvagem (=), ou então, ter ausência (0), diminuição (-) ou aumento (+) de uma destas duas características fenotípicas típicas do cancro cítrico. Seis padrões fenotípicos puderam ser encontrados: Perda total de hiperplasia e necrose quando inoculado em laranja e limão (**Tabela 2**); Perda total de hiperplasia e necrose quando inoculado em limão e parcial em laranja (**Tabela 3**); Perda total de hiperplasia e parcial de necrose (**Tabela 4**); Ausência e/ou diminuição de hiperplasia e/ou necrose (**Tabela 5**); Nenhuma modificação sintomática (**Tabela 6**) e Aumento de necrose (**Tabela 7**).

Apesar de um exaustivo trabalho, para a obtenção dos registros fotográficos obtidos de cada um dos clones A, B e C de todos os 53 mutantes nos 4º, 8º, 12º e 16º dias após inoculação em *Citrus sinensis* (Laranjeira pêra-Rio) e em *Citrus limonia* (limoeiro cravo), apresentaremos aqui apenas as fotos retiradas no 16º dia, de um dos clones (A ou B) e daqueles mutantes que levaram a redução no processo patogênico.

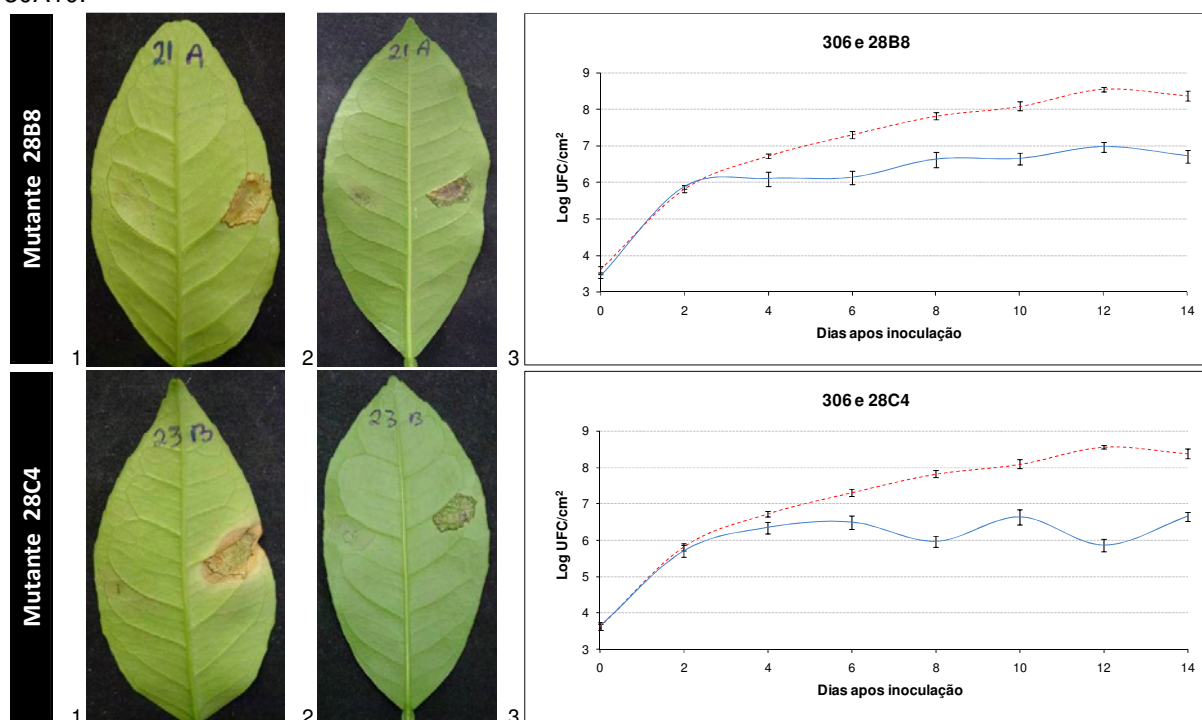
Os gráficos das curvas de crescimento *in vivo* mostraram numericamente as diferenças na capacidade de multiplicação de 19 mutantes em comparação com a *X. citri* selvagem quando crescidas em *Citrus limonia*.

Tabela 02 - Mutantes que levaram a perda total de patogenicidade em laranja e limão.

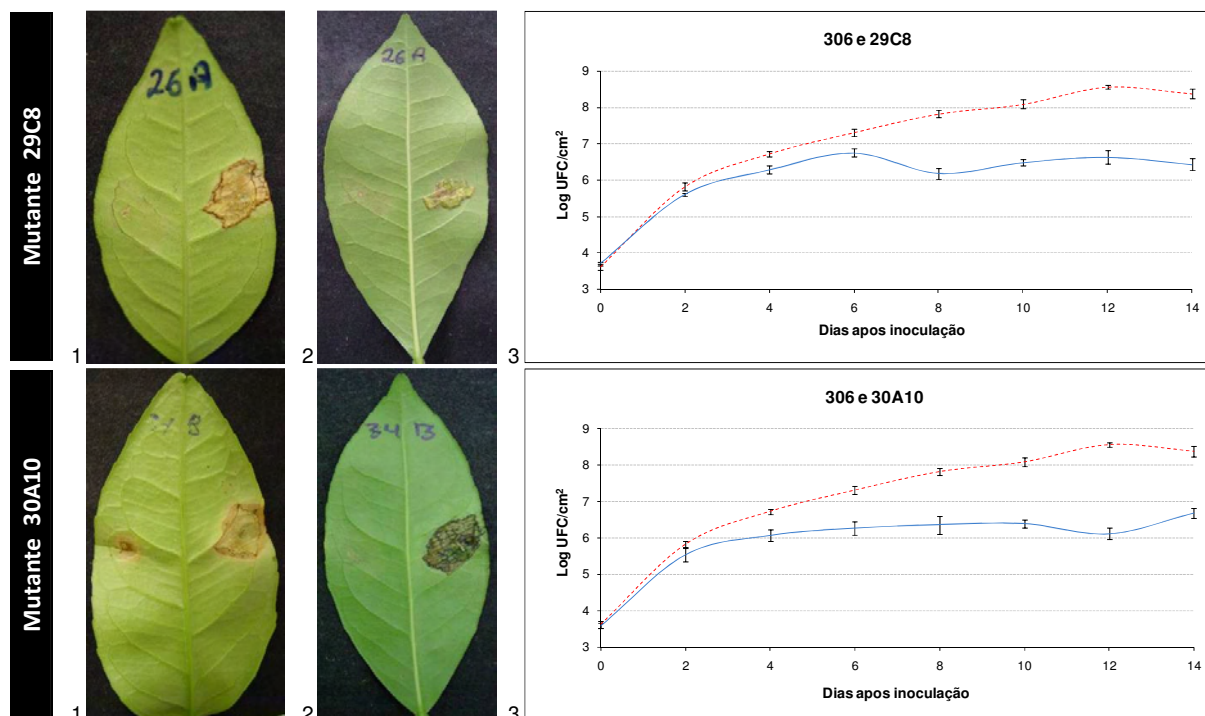
Mutantes	Laranja ¹		Limão ²	
	Hip ³	Nec ⁴	Hip ³	Nec ⁴
28B08	0	0	0	0
28C04	0	0	0	0
29C08	0	0	0	0
29G09	0	0	0	0
29H09	0	0	0	0
30A08	0	0	0	0
30A10	0	0	0	0
33G03	0	0	0	0
34G10	0	0	0	0

¹ *Citrus sinensis*. ² *Citrus limonia*. ³ Hiperplasia. ⁴ Necrose. O zero (0) indica perda total de patogenicidade.

Figura 11 - Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento *in vivo* dos mutantes 28B8, 28C4, 29C8 e 30A10.



Continua na próxima página



¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem. ³ A linha continua refere-se a *X. citri* mutante e a linha tracejada a *X. citri* selvagem.

A **Figura 11** expõe que os mutantes 28B8, 28C4, 29C8 e 30A10 não causaram doença em planta e cresceram cerca de 100 vezes menos do que a *X. citri* selvagem. Os genes nocauteados destes mutantes são, respectivamente, o XAC1574 que codifica a proteína transportadora de fosfato ABC ATP Obrigatória (pstB), o XAC0732 que codifica uma proteína hipotética, o XAC2265 que codifica a proteína Helicase IV (helD) e o XAC3981 que também codifica uma proteína hipotética.

A proteína pstB faz parte do sistema pst, conhecida também como proteína ABC, responsável pela absorção do fosfato. Função esta, de fundamental importância na fisiologia celular da bactéria, pois o fosfato é exigido como nutriente. O sistema Pst de *E. coli* é composta por quatro subunidades distintas codificada pelo pstS, pstA, pstB e pstC. Em *X. citri* estas quatro proteínas são codificados pelos genes xac1577 (pstS), xac1575 (pstA), xac1574 (pstB) e xac1576 (pstC). A proteína pstS é a proteína de ligação ao fosfato localizada no espaço Periplasmático. As proteínas pstA e pstC são

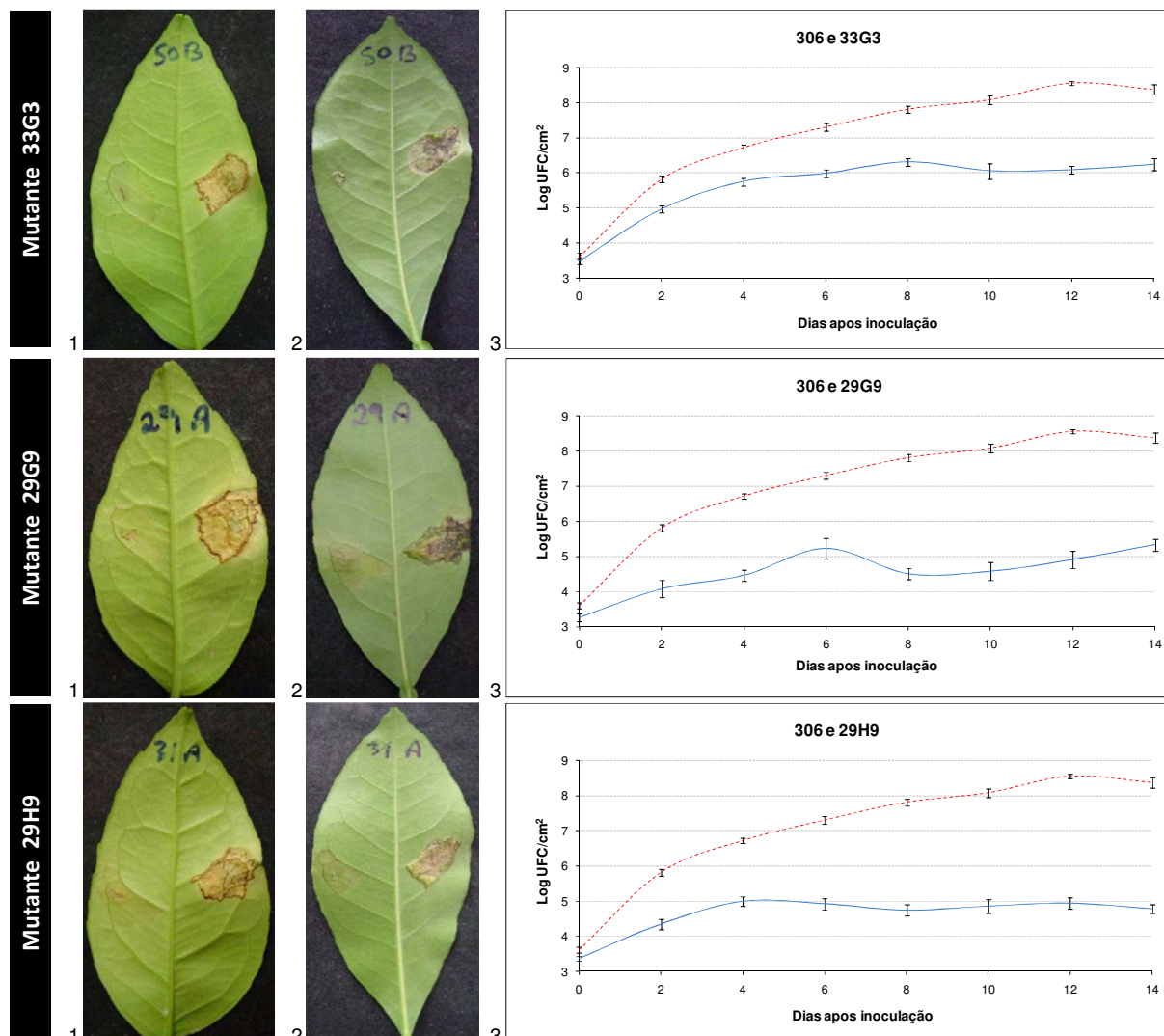
hidrofóbicas e formam a porção trans-membrana do sistema Pst e a proteína pstB é a subunidade catalítica, responsável pela hidrólise do ATP, fornecendo energia para o sistema Pst, possibilitando assim, a importação do fosfato através da membrana celular (NCBI, 2009).

O gene XAC0732 codifica uma proteína hipotética que aparentemente é restrita ao gênero *xanthomonas*, já que, em uma pesquisa no NCBI (2009), onde foi inserida sua seqüência fasta, foi encontrado similaridade apenas com duas proteínas hipotéticas, sendo uma da espécie *X. campestris* pv. *vesicatoria* e outra da *X. oryzae* pv. *oryzae*. De acordo com o NCBI (2009) este gene apresenta o motivo “pro_rich” região rica em códons de prolina, o que poderia significar que como os genes *pthA*, estas regiões repetidas de prolina possam ser sítios de ligação para os genes de resistência da planta.

A proteína Helicase IV (helD) faz parte de um grupo de enzimas que desempenham um papel crucial na recombinação homóloga e no reparo do DNA (MENDONCA et al., 1995). Ainda segundo MENDONCA et al. (1995) ela esta envolvida tanto na recombinação gênica entre as fitas simples de DNA, quanto no processo de cruzamento das fitas de DNA durante a migração sináptica. É uma proteína compartilhada por muitos outros microorganismos (NCBI, 2009).

O gene XAC3981, codifica uma proteína hipotética que possui alta similaridade, de acordo com o NCBI (2009), com proteínas, também hipotéticas, do genero *Xanthomonas* sp. (*X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* e *X. oryzae* pv. *oryzicola*), da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* e da bactéria *Xylella fastidiosa*.

Figura 12 - Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento *in vivo* dos mutantes 33G3, 29G9 e 29H9.



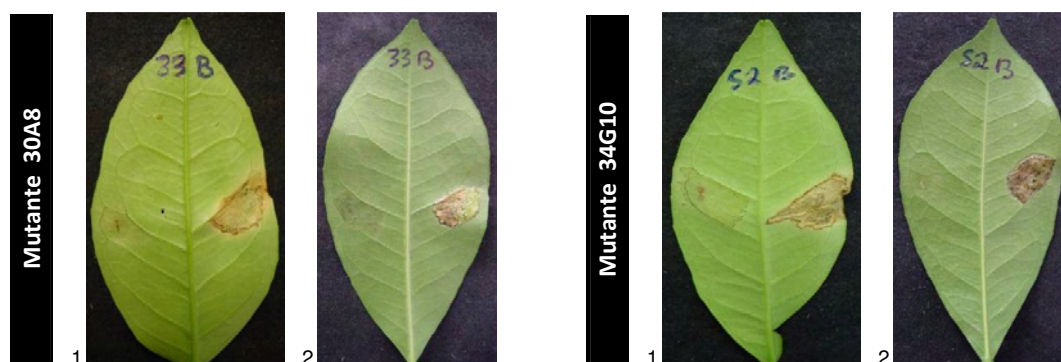
¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem. ³ A linha contínua refere-se a *X. citri* mutante e a linha tracejada a *X. citri* selvagem.

A **Figura 12** mostrou que os mutantes 33G3, 29G9 e 29H9 não causaram doença em planta e cresceram, respectivamente, cerca de 200, 1000 e 5000 vezes menos do que a *X. citri* selvagem. O gene nocauteado do mutante 33G3 ainda não foi seqüenciado e os genes nocauteados dos mutantes 29G9 e 29H9 são, respectivamente, o XAC0068 e XAC3278 que codificam proteínas hipotéticas.

O gene XAC0068 mostrou similaridade com inúmeros outros genes hipotéticos de um grande número de microorganismos entre bactérias e fungos (NCBI, 2009), o que evidencia se tratar de um gene envolvido no metabolismo basal.

O gene XAC3278 possui alta similaridade apenas com a proteína hipotética XAC2120 da própria *X. citri* (E. value = $9e-41$). Este gene apresenta um domínio conservado chamado BLUF. O domínio BLUF é FAD dependente e demonstrou estar vinculado à proteína Appa, que por sua vez está envolvida na repressão de genes de fotossíntese em resposta ao fator ambiental da luz azul (NCBI, 2009). Talvez o gene XAC3278 faça o papel ambiental dado pela cor azul, ativando o gene AppA da planta infectada, e conseqüentemente fazendo com que esta diminua a produção de fotossíntese no local atacado, o que explicaria um dos sintomas característico do cancro, um halo de cor amarelado.

Figura 13 - Avaliações Fenotípicas dos mutantes 30A8 e 34G10.



¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem.

A **Figura 13** mostrou que os mutantes 30A8 e 34G10 perderam a capacidade de causar doença em planta. Apesar de não realizadas as curvas de crescimento para estes mutantes fica claro que os genes interrompidos destes mutantes são vitais ao processo de patogenicidade.

O mutante 30A8 teve nocauteado o gene XAC1722 responsável por codificar a proteína 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintase (IspF), enzima integrante da via de biossíntese de esteróides. Esta proteína foi identificada pela técnica de MudPIT em

extratos após 3 dias de infecção (FACINCANI, 2007), indicando que há produção desta proteína durante o processo patogênico. Esta enzima catalisa o quinto passo na via alternativa (não melanovato) da biossíntese de terpenóide (EISENREICH et al., 1998) e parece ser essencial no processo patogênico indicada pelos resultados verificados pela avaliação fenotípica.

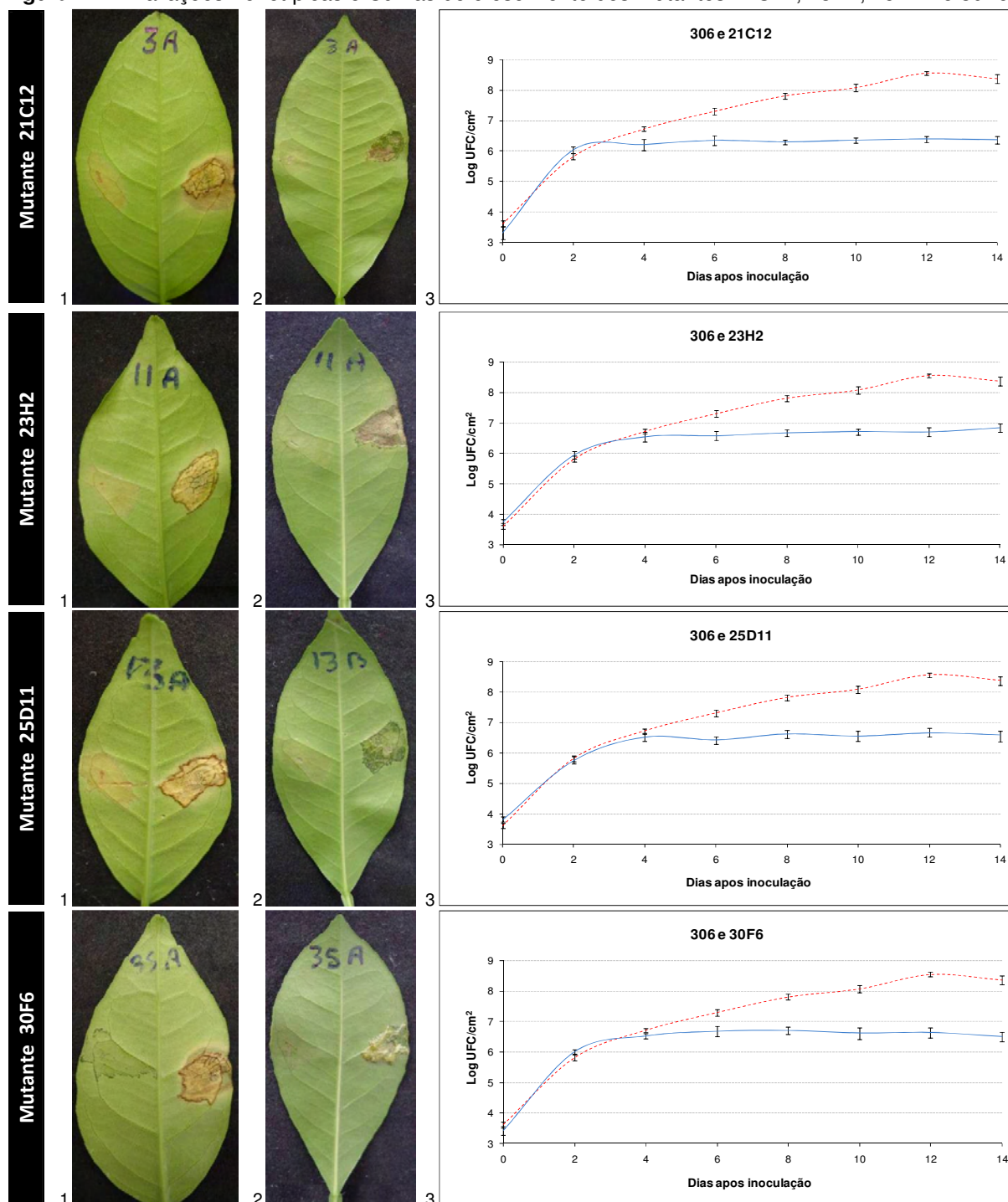
O gene nocauteado do mutante 34G10 (XAC3211) codifica a proteína Trealose 6-fosfato sintase (ostA), proteína relacionado ao metabolismo do amido e sacarose, que evidentemente participa direta ou indiretamente no processo patogênico.

Tabela 03 - Mutantes que levaram a perda total de patogenicidade em limão e parcial em laranja.

Mutantes	Laranja ¹		Limão ²	
	Hip ³	Nec ⁴	Hip ³	Nec ⁴
21C12	0	-	0	0
23H02	0	-	0	0
25G07	0	-	0	0
25D11	0	-	0	0
30F06	-	0	0	0
18A01	-	-	0	0
32D03	-	-	0	0
33B11	-	-	0	0

¹ *Citrus sinensis*. ² *Citrus limonia*. ³ Hiperplasia. ⁴ Necrose. O zero (0) indica perda total de hiperplasia ou necrose e o símbolo de diferença (-) redução.

Figura 14 - Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento dos mutantes 21C12, 23H2, 25D11 e 30F6.



¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem. ³ A linha continua refere-se a *X. citri* mutante e a linha tracejada a *X. citri* selvagem.

A **Figura 14** mostrou que os mutantes 21C12, 23H2, 25D11 e 30F6 não induziram cancro em limão, onde cresceram cerca de 100 vezes menos do que a *X. citri* selvagem. Em laranja, os mutantes 21C12, 23H2, 25D11 provocaram uma reduzida necrose e o mutante 30F6 uma leve hiperplasia.

O mutante 21C12 teve o gene XAC0075 nocauteado, que é responsável pela codificação da proteína semelhante a repressor de xilose (xylR). Esta proteína é compartilhada por muitos outros seres vivos (NCBI, 2009). Possui vários domínios da família ROK e o domínio NagC, todos envolvidos no metabolismo e transporte de carboidratos.

Dados da literatura relatam que existe na região promotora de genes responsáveis pela ativação da expressão de fatores de patogenicidade e virulência uma sequência consenso de nucleotídeos (TTCGC...N15...TTCGC) denominado “PIP box” ou “Plant-Inducible-Promoter Box” (FENSELAU & BONAS, 1995). Esses genes são regulados de maneira dependente à proteína HrpX, que se liga na sequência do “PIP Box” e ativa a transcrição dos mesmos (SILVA et al., 2002; WHALEN et al., 1993). Por sua vez o gene HrpX faz parte do Sistema de secreção tipo III (SSTT), sistema este, composto de 20 proteínas, sendo que a maioria está localizada na membrana interna da bactéria, e juntas injetam vários fatores de patogenicidade e virulência, denominados efetores, para dentro do citosol de células eucarióticas (CORNELIS & VAN GYSEGEM, 2000). CARVALHO (2006) em um estudo sobre promotores da expressão gênica bacteriana modulado pela planta descobriu-se um PIP Box no gene XAC0075, o que poderia indicar que o gene XAC0075 possa estar relacionado ao processo patogênico não pela síntese desta proteína e sim pela regulação de outros conjuntos de genes.

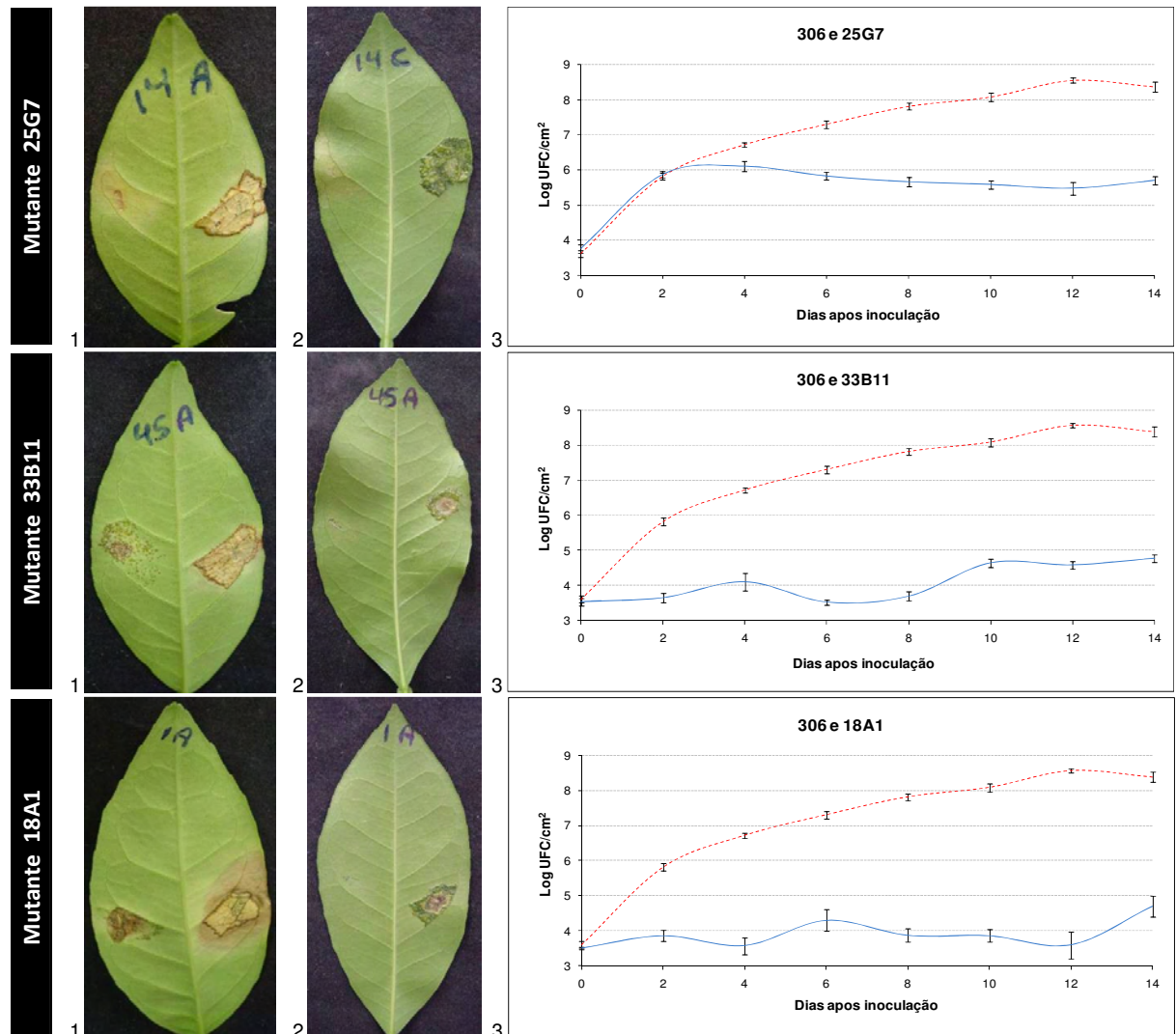
O mutante 23H2 teve o gene XAC3311 nocauteado responsável por codificar um receptor dependente de TonB. Estes receptores encontram-se na membrana externa e possuem a função de transportar o complexo sideróforo/Fe²⁺ para o interior da célula bacteriana. Este sistema é de fundamental importância, já que participa ativamente na captação de ferro, elemento este, essencial para o metabolismo bacteriano, atuando em processos como respiração, síntese de RNA e na ativação de espécies ativas de oxigênio (WANDERSMAN & DELEPELAIRE, 2004). Foram anotados, no genoma da *X.*

citri 306, 46 genes codificadores de receptores dependentes de Ton-B, contudo estes genes devem possuir diferenças entre si e ter funções específicas dentro do metabolismo bacteriano, já que enquanto o gene XAC3311 parece ser essencial ao processo patogênico, o nocaute do gene 3444, referente ao mutante 34C2 mostrada na **Tabela 5**, que também codifica um receptor dependente de TonB, parece não influenciar neste processo. É uma proteína compartilhada por uma grande número de outros microorganismos (NCBI, 2009).

O gene XAC1927 nocauteado do mutante 25D11 é o responsável por codificar a Fe-S oxidoreductase, proteína envolvida em processos de oxido-redução dentro da célula bacteriana, reparo do DNA, síntese de vitaminas e coenzimas, e em fungos na biossíntese de muitos antibióticos (NCBI, 2009). A análise pelo programa PSORT prediz que esta proteína esteja localizada no citoplasma, associada à membrana plasmática bacteriana, possivelmente associada a algum complexo protéico envolvido no transporte de fatores de patogenicidade da bactéria para a planta ou vice versa. O nocaute desta proteína no patógeno implica em drástica perda da capacidade da bactéria em causar a doença. Esta proteína parece possuir características pouco comuns, já que, é encontrada apenas em *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478, tornando um bom alvo para a produção de uma possível droga contra a doença.

O gene XAC1491 nocauteado (mutante 30F6) é o responsável por codificar uma proteína hipotética. A partir de uma análise no banco do NCBI (2009) constatou-se que este gene deva ter peculiaridades extremamente específicas, já que não foi encontrado similaridade com nenhum outro gene do banco.

Figura 15 - Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento *in vivo* dos mutantes 25G7, 33B11 e 18A1.



¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem. ³ A linha continua refere-se a *X. citri* mutante e a linha tracejada a *X. citri* selvagem.

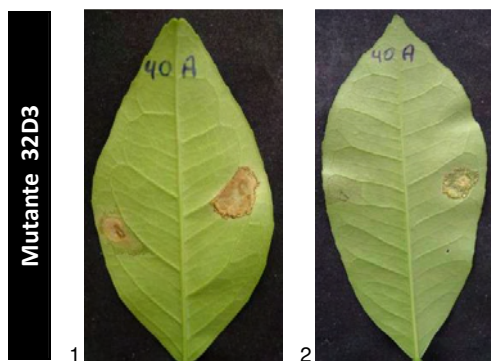
A **Figura 15** mostrou que os mutantes 25G7, 33B11 e 18A1 não induziram cancro em limão, onde cresceram, respectivamente, cerca de 500, 5.000 e 10.000 vezes menos do que a *X. citri* selvagem. Em laranja, o mutante 25G7 provocou uma reduzida necrose e os mutantes 33B11 e 18A1 uma deduzida necrose acompanhada de uma leve hiperplasia.

O gene nocauteado do mutante 33B11 ainda não foi seqüenciado e os genes nocauteados dos mutantes 25G7 e 18A1 são, respectivamente, o XAC2457 e XAC3906 que codificam, respectivamente, as proteínas Citocromica ubiquinol oxidoreductase (petA) e Proteína de divisão cromossômica (parB).

A proteína petA (XAC2457) juntamente com o petB (XAC2456) e petC (XAC2455) fazem parte do complexo citocromico c-redutase, integrante das vias metabólicas relacionadas a fosforilação oxidativa. Sendo a fosforilação oxidativa um processo comum aos seres vivos fica evidente que o gene petA é compartilhado pela grande maioria dos seres vivos (NCBI, 2009).

A Proteína parB (XAC3906) esta relacionado com a divisão celular. Em *Caulobacter crescentus*, os genes que codificam as proteínas de divisão cromossômica parA e parB, são essenciais. Por meio da técnica de microscopia de imunofluorescência, pôde-se revelar que a falta destes genes, em *C. Crescentus*, bloquearam os processos moleculares responsáveis pelos eventos iniciais da divisão celular bacteriana (MOHL, 2001). A partir de técnicas de expressão gênica, a proteína parB mostrou ser induzida em *X. citri* após 12 h de crescimento em meio indutor de patogenicidade XAM1 (LAIA, 2007), constatando a sua importância neste processo.

Figura 16 - Avaliação Fenotípica do mutante 32D3.



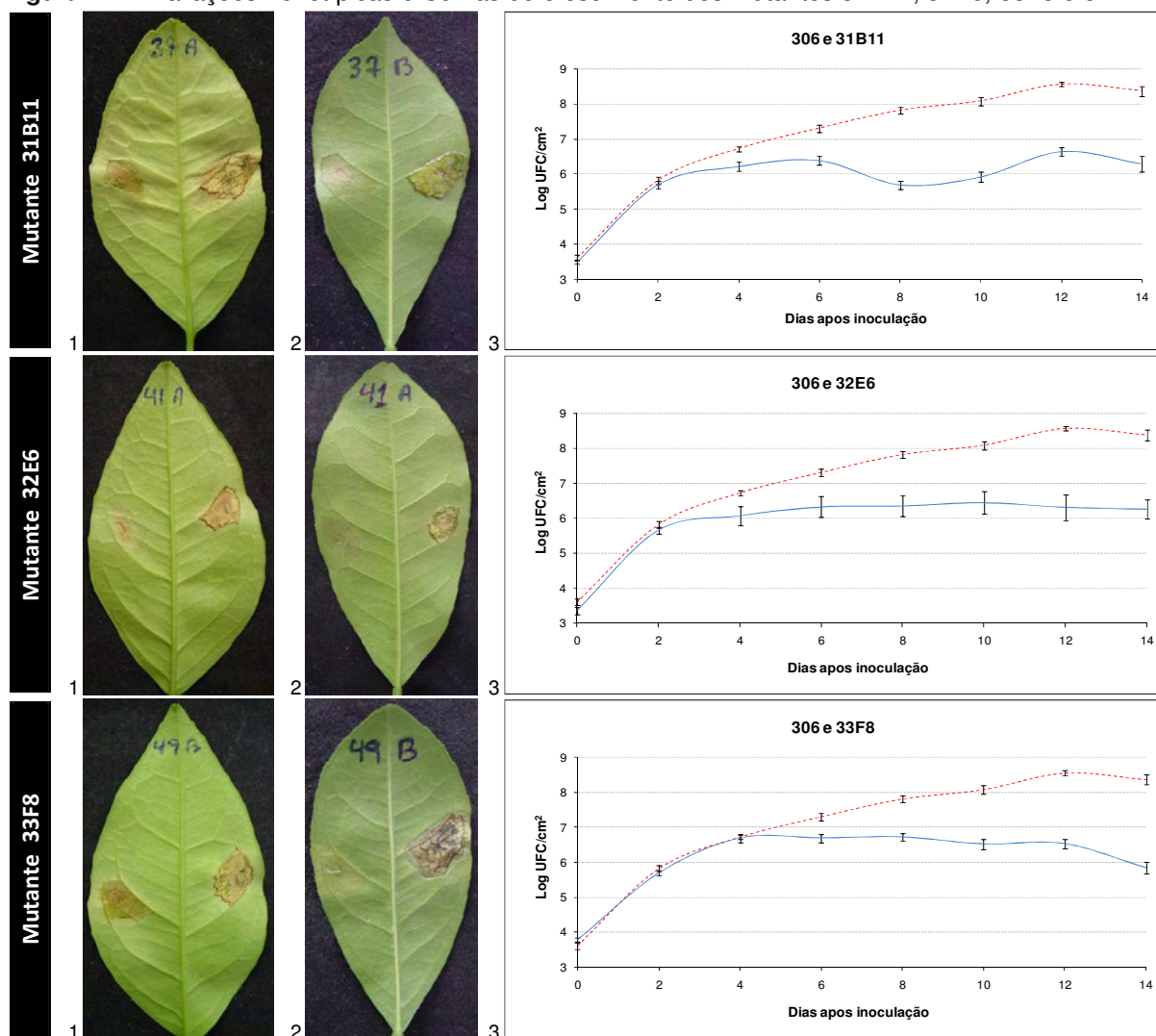
¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem.

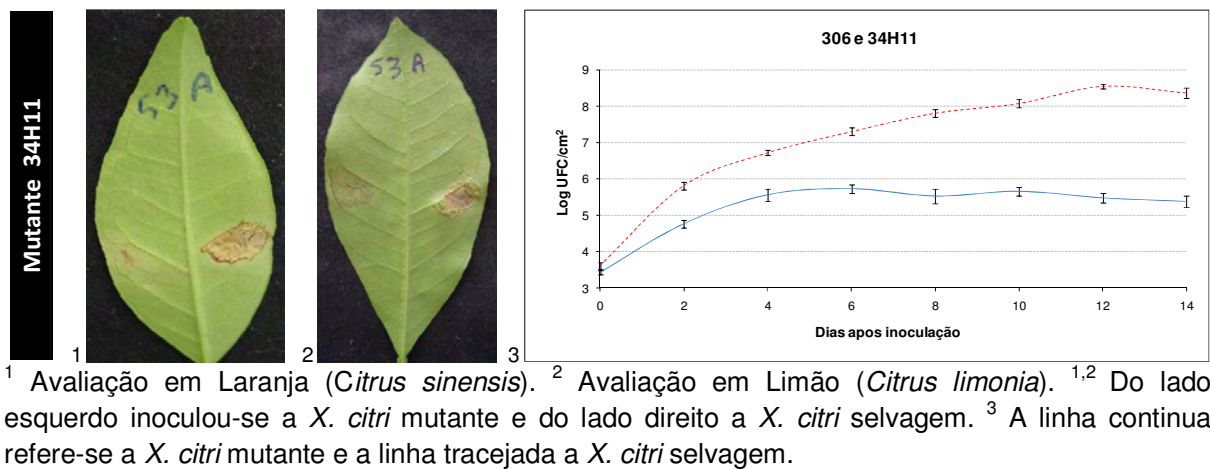
A **Figura 16** mostrou que o mutante 32D3 não induziu cancro em limão e uma deduzida necrose acompanhada de uma leve hiperplasia em laranja. O gene nocauteado deste mutante foi XAC1107 que codificam uma Integrase.

Tabela 04 - Mutantes que levaram a perda total de hiperplasia e parcial de necrose.

Mutantes	Laranja ¹		Limão ²	
	Hip ³	Nec ⁴	Hip ³	Nec ⁴
34H11	0	-	0	-
21B10	0	-	0	-
22A11	0	-	0	-
23H01	0	-	0	-
31B11	0	-	0	-
32E06	0	-	0	-
33F08	0	-	0	-

¹ *Citrus sinensis*. ² *Citrus limonia*. ³ Hiperplasia. ⁴ Necrose. O zero (0) indica perda total de hiperplasia ou necrose e o símbolo de diferença (-) redução.

Figura 17 - Avaliações Fenotípicas e Curvas de crescimento dos mutantes 31B11, 32E6, 33F8 e 34H11.

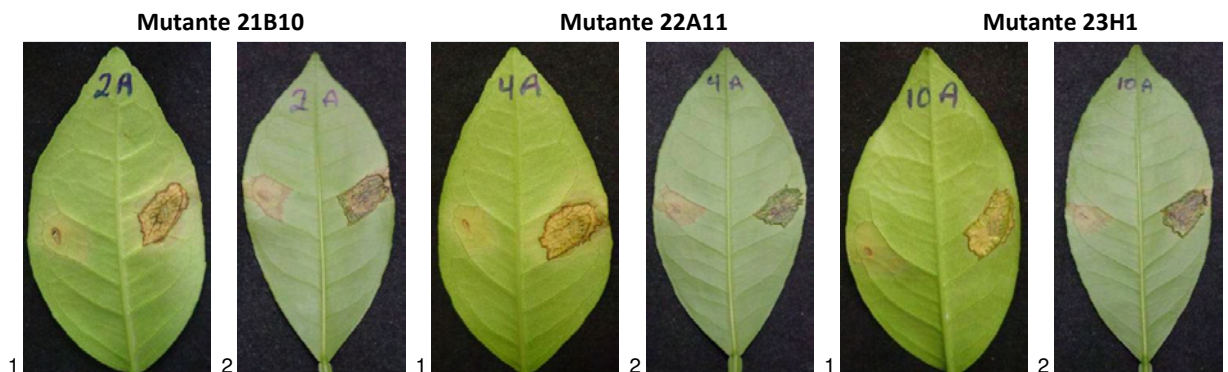


A **Figura 17** mostrou que os mutantes 31B11, 32E6, 33F8 e 34H11 não puderam causar hiperplasia, mas levaram a uma reduzida necrose. Estes mutantes cresceram, respectivamente cerca de 100, 100, 500 e 1000 vezes menos do que a *X. citri* selvagem. O gene nocauteado do mutante 32E6 ainda não foi seqüenciado e os genes nocauteados dos mutantes 31B11, 33F8 e 34H11 são, respectivamente, o gene XAC1720 que codifica a Proteína de Divisão Celular FtsB (FtsB), o gene XAC1258 que codifica o citocromo O ubiquinol oxidase Subunidade II (cyoA) e o gene XAC3368 que codifica uma proteína hipotética.

Relacionada ao processo de fosforilação Oxidativa, a enzima cyoA, codificada pelo gene XAC1258, catalisa a oxidação de ubiquinol com a concomitante redução do oxigênio molecular à água. Esta por sua vez, atua comoceptor final de elétron da cadeia respiratória. A fração subunidade II é responsável pela ligação e oxidação do substrato ubiquinona. É uma proteína encontrada em um grande número de seres vivos.

O gene XAC3368 possui similaridade apenas com as proteínas metaloendopeptidase putativo de *X. campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10 (E. value = 3e-88), Domínio protéico M23 peptidase de *X. oryzae* pv. *oryzae* PXO99A (E. value = 7e-83) e a proteína hipotética XOO1178 de *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 (E. value = 3e-82). Possui o domínio conservado denominado 23 Peptidase que é uma endopeptidase Gly-Gly, que aparentemente é importante para o processo patogênico

Figura 18 - Avaliações fenotípicas dos mutantes 21B10, 22A11 e 23H1.



¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem.

A **Figura 18** mostrou que os mutantes 21B10, 22A11 e 23H1 não causaram hiperplasia, mas levaram a uma reduzida necrose. Os genes nocauteados por estes mutantes foram, respectivamente, o gene XAC1531 que codifica uma proteína hipotética, o gene XAC1189 que codifica uma ferredoxina e o gene XAC2578 responsável por codificar a proteína GumI.

Esta proteína GumI é uma enzima glicosiltransferase V responsável pela transferência de um resíduo de b-manosil de GDP-manose para glucoronil-(b-1,2)-manosil-(a-1,3)-celobiose difosfoliprenol, com a formação de manosil-(b-1,4)-glucuronil-(b-1,2)-manosil-(a-1,3)-celobiose difosfoliprenol (KATZEN et al., 1998). KATZEN et al. (1998) relatou que mutantes gumI são incapazes de adicionar a segunda manose ao tetrassacarídeo ligado ao lipídio, o que afeta parcialmente o índice de virulência dessa estirpe mutante.

O gene XAC2578 faz parte de um agrupamento de 14 genes envolvidos na síntese da goma xantana, polissacarídeo extracelular (EPS) relacionado à formação do encharcamento (hiperplasia) durante a colonização do tecido pelas *Xanthomonas* (RUDOLPH, 1993). A goma xantana é um fator de fitopatogenicidade uma vez que mutantes deficientes em EPS são geralmente avirulentos (CHOU, 1997; KATZEN, 1998; KEMP, 2004). Além disso, RAMIREZ et al. (1988) demonstrou a existência de uma correlação entre o grau de viscosidade da goma produzida e a virulência de alguns isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. Estes autores propuseram ainda que a

estrutura conformacional deste polissacarídeo possa estar associada à virulência da bactéria, o que vem a reforçar a hipótese da necessidade de um reconhecimento molecular patógeno-hospedeiro para a ocorrência de infecção (MORRIS et al., 1977).

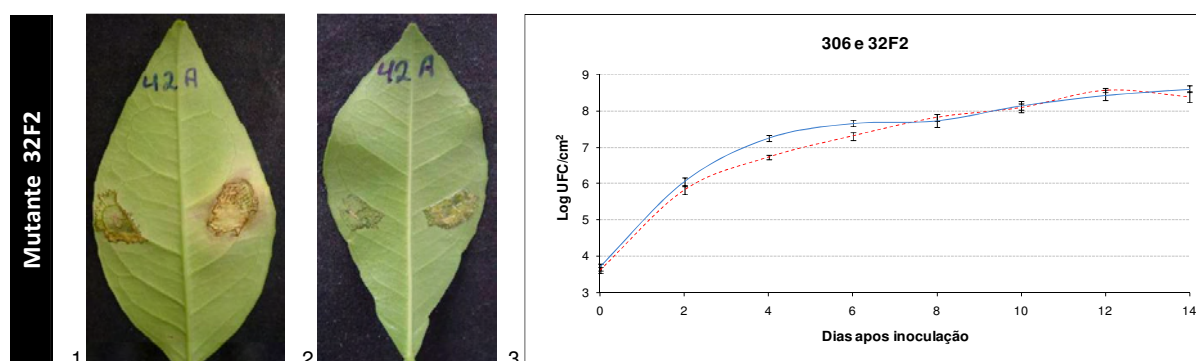
A proteína GumI foi identificada pela técnica de identificação protéica MudPIT em extratos após 3 dias de infecção em planta (FACINCANI, 2007), o que corrobora com o fato da goma xantana ser produzida nos momentos iniciais de infecção, concomitantemente ao encharcamento do tecido do hospedeiro, permitindo sua fixação, colonização e adaptação a nova condição infectante.

Tabela 05 - Mutantes que levaram a ausência e/ou diminuição de hiperplasia e/ou necrose.

Mutantes	Laranja ¹		Limão ²	
	Hip ³	Nec ⁴	Hip ³	Nec ⁴
28A12	=	-	=	-
29G05	=	0	-	0
32F02	-	-	-	-
32F10	-	-	-	-
33E04	-	=	-	+

¹ *Citrus sinensis*. ² *Citrus limonia*. ³ Hiperplasia. ⁴ Necrose. O zero (0) indica perda total de hiperplasia ou necrose, o símbolo de diferença (-) redução, de soma (+) aumento e igualdade (=) mesmo padrão apresentado pela *X. citri* selvagem.

Figura 19 - Avaliação Fenotípica e Curva de crescimento *in vivo* do mutante 32F2.

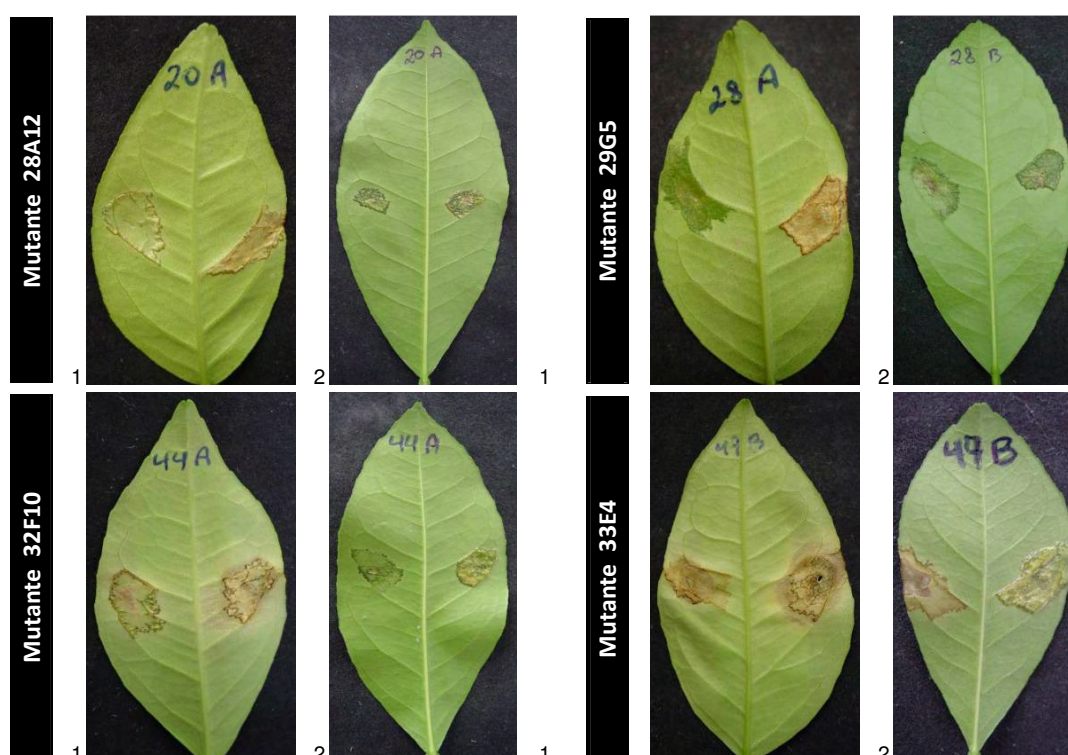


¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem. ³ A linha contínua refere-se a *X. citri* mutante e a linha tracejada a *X. citri* selvagem.

O mutante 32F2 (**Figura 19**) teve nocauteado o gene XAC0903 responsável por codificar o regulador de nucleosídeo difosfato quinase (rnK). Relacionada à biossíntese de fatores de Transcrição esta proteína é encontrada em um grande número de

microorganismos (NCBI, 2009). Dentre todos os mutantes apresentado neste trabalho, este foi o único que apresentou uma curva similar a *X. citri* 306, mas que divergiu desta no que se refere aos sintomas, já que com base na avaliação fenotípica este mutante levou a claras reduções de hiperplasia e necrose. A falta deste regulador possibilitou que o mutante 32F2 se multiplicasse tão bem quanto a *X. citri* selvagem, mas interferiu no processo patogênico, diminuindo os sintomas provocados na planta sensivelmente.

Figura 20 - Avaliações fenotípicas dos mutantes 28A12, 29G5, 32F10 e 33E4.



¹ Avaliação em Laranja (*Citrus sinensis*). ² Avaliação em Limão (*Citrus limonia*). ^{1,2} Do lado esquerdo inoculou-se a *X. citri* mutante e do lado direito a *X. citri* selvagem.

A **Figura 20** mostrou que os mutantes 28A12, 29G5, 32F10 e 33E4 tiveram claras reduções de hiperplasia e/ou necrose. Os genes nocauteados destes mutantes são, respectivamente, o gene XAC1111 que codifica a proteína de recombinação RecR, o gene XAC1008 que codifica uma proteína hipotética, o gene XAC2234 que codifica o Transportador MFS e o gene XAC0726 que codifica a proteína Hidrolase metil paration (mpd).

Apesar da proteína nocauteada do mutante 29G5 ainda estar classificada como uma proteína hipotética conservada, estudos de análises de expressão gênica, mostrou que esta proteína é induzida em *X. citri selvagem* após 3 dias de inoculação em planta (LAIA, 2007), evidenciando sua importância no processo patogênico e corroborando com os dados apresentados aqui pela avaliação fenotípica.

Ainda a partir de técnicas de expressão gênica, a proteína Transportadora MFS (mutante 32F10) mostrou ser reprimida em *X. citri* após 24 h de crescimento em meio indutor de patogenicidade XAM1 (LAIA, 2007), evidenciando que esta proteína não esteja diretamente ligada aos processos patogênicos, mas que cause algum efeito metabólico suficiente para a diminuição dos sintomas de cancro.

Tabela 06 - Mutantes que levaram a nenhuma modificação aparente dos sintomas de cancro cítrico.

Mutantes	Laranja ¹		Limão ²	
	Hip ³	Nec ⁴	Hip ³	Nec ⁴
22E09	=	=	=	=
23D06	=	=	=	=
25D08	=	=	=	=
25H09	=	=	=	=
26F10	=	=	=	=
27E10	=	=	=	=
28B09	=	=	=	=
28G05	=	=	=	=
29C11	=	=	=	=
29H04	=	=	=	=
29H10	=	=	=	=
30G01	=	=	=	=
31E12	=	=	=	=
32B11	=	=	=	=
32F06	=	=	=	=
33D09	=	=	=	=
34C02	=	=	=	=

¹ *Citrus sinensis*. ² *Citrus limonia*. ³ Hiperplasia. ⁴ Necrose. O símbolo de igualdade (=) indica mesmo padrão apresentado pela *X. citri* selvagem.

Apesar dos mutantes da **Tabela 06** inicialmente ter apontado possuir diferenças em relação a *X. citri* selvagem, nesta avaliação fenotípica, feita de forma mais apurada e no decorrer de vários dias, não foi possível, pelo menos superficialmente, detectar esta diferença. Todos eles se comportaram, em planta, de forma similar a selvagem.

O mutante 23D06 correspondente ao mutante que teve o gene XAC1256 nocauteado. Este gene está relacionado à biossíntese de esteróides e codifica a proteína de tolerância à penicilina (LytB), conhecida como 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato redutase. FACINCANI (2007), por meio da eletroforese bidimensional seguida de espectrometria de massas, mostrou que esta proteína tem sua produção inibida em meio CN indutor de patogenicidade em até 40 vezes em comparação ao observado em *X. citri* selvagem nas mesmas condições. Esta diminuição indica que essa proteína não é necessária quando esta bactéria está em planta ou em meio indutor de patogenicidade, já que compostos tóxicos com propriedades semelhantes aos efeitos da penicilina dificilmente é encontrada nestas condições. Estes dados reiteram os resultados apresentados aqui, pois o mutante 23D06 em planta não sofreu nenhuma perda na sua capacidade de causar a doença do Cancro cítrico.

A ausência da proteína Ribonuclease D no mutante 29H10, aparentemente não interfere no processo patogênico, contudo a partir de técnicas de expressão gênica esta proteína mostrou um resultado curioso. Ela foi reprimida em *X. citri* no 1º dia e induzida no 3º após ser inoculada em planta (LAIA, 2007).

Ainda a partir de técnicas de expressão gênica a proteína Peptidil-prolil cis-trans isomerase (mutante 30G1) mostrou ser reprimida em *X. citri* no 1º e 5º dia após ser inoculada em planta (LAIA, 2007). Esta proteína está relacionada com a tradução e modificação protéica, no entanto parece não estar envolvida diretamente com o processo patogênico, já que, a falta desta proteína em *X. citri* (mutante 30G01) não trouxe nenhuma modificação aparente nas características e ainda explicaria o porquê de ser reprimida em planta.

A proteína Protease específica para cauda (mutante 29H04) também não se mostrou vital ao processo patogênico. Em estudos de expressão gênica ela foi induzida em *X. citri* após 12 h de crescimento em meio indutor de patogenicidade XAM1, mas não teve sua expressão modificada em planta (LAIA, 2007). Apesar da entrada da bactéria em planta ser feita de forma passiva, talvez esta proteína, por estar relacionada à cauda, possa aumentar sua eficiência em penetrar no hospedeiro. O fato das inoculações introduzir diretamente o patógeno no interior do mesofilo explicaria o motivo

de sua expressão, em planta, não sofrer alteração. O meio XAM1 talvez tenha características indutoras que imitem aquelas presentes na superfície foliar ou espaços estomáticos, o que esclareceria do porque desta proteína ser induzida neste meio.

Tabela 07 - Mutantes que levaram a um aumento de necrose.

Mutantes	Laranja ¹		Limão ²	
	Hip ³	Nec ⁴	Hip ³	Nec ⁴
23B12	=	=	=	+
26E01	=	=	=	+
33E07	=	=	=	+
23A08	=	+	=	+
23G12	=	+	=	+
25H02	=	+	=	+
29B05	=	+	=	+

¹ *Citrus sinensis*. ² *Citrus limonia*. ³ Hiperplasia. ⁴ Necrose. O símbolo de soma (+) indica aumento de hiperplasia ou necrose e igualdade (=) mesmo padrão apresentado pela *X. citri* selvagem.

Os mutantes da **Tabela 07** mostraram evidências de um aumento na capacidade de causar necrose em planta. Sabendo que o processo necrótico do tecido infectado com o patógeno é um dos meios de defesa na qual a planta dispõe para isolar e exterminar o invasor podemos inferir que o nocaute das proteínas destes mutantes interferiu no processo patogênico, permitindo que a planta reconhecesse com mais facilidade o agressor. Entre estas proteínas estão proteínas relacionada ao Plasmídeo (mutante 23B12), 5-metiltetrahydropterotriglutamato-homocisteína metiltransferase (mutante 33E07) e Leucina aminopeptidase (mutante 23G12).

Apesar da proteína nocauteada do mutante 29B05 ainda estar classificada como uma proteína hipotética conservada, estudos de análises de expressão gênica, mostrou que esta proteína é induzida em *X. citri* selvagem logo no início da infecção (nas primeiras 24 h) (LAIA, 2007), evidenciando alguma importância no processo patogênico e corroborando com os dados apresentados aqui pela avaliação fenotípica, uma vez que este mutante pode ser reconhecido mais facilmente pelos mecanismos de defesa da planta.

Como resultado geral de todas as avaliações fenotípicas temos que as mutações oriundas pela inserção aleatória do derivado comercial do transposon Tn5 da EPICENTRE são estáveis, já que em nenhum momento, ao longo de 2 anos de experimentos, os mutantes mudaram seus fenótipos. Foi observável também, a partir destas avaliações, que alguns mutantes causaram a doença mais facilmente quando inoculados em Laranja pêra-rio (*Citrus limonia*) do que quando inoculados em limão cravo (*Citrus sinensis*). Tal fenômeno indicaria que estes mutantes tiveram nocauteados genes que sofrem influencia ou são modulados por fatores externos, como o mesófilo da planta.

Em relação às curvas de crescimento, temos que a *X. citri* 306 se mostrou em multiplicação crescente até o 12º dia, quando então se estabilizou, possivelmente em consequência das baixas condições nutricionais do local inoculado. Como todos os mutantes, a *X. citri* selvagem iniciou sua multiplicação com 10^3 a 10^4 UFC/cm², mas após 14 dias de crescimento *in vivo*, diferentemente da maioria dos mutantes, atingiu 10^8 UFC/cm². Os primeiros sintomas surgiram entre o 4º e o 6º após inoculação, quando sua curva já indicava aproximadamente 10^7 UFC/cm² e após os 14 dias de experimento já exibia todos os sintomas típicos da doença, como hiperplasia e necrose bem acentuados.

É interessante notar que nenhum dos mutantes que não causaram sintomas em planta ultrapassaram a casa dos 10^7 UFC/cm², sugerindo que talvez seja necessário um número mínimo de bactérias, possivelmente entre 10^6 UFC/cm² e 10^7 UFC/cm², para dar início ao processo patogênico. Tais resultados, indicam que talvez o processo patogênico ocorra em 2 etapas: na primeira os genes seriam responsável pelo início de multiplicação, adaptação, e “camuflagem” da bactéria dentro da planta (até o 2º dia) sem causar sintomas. Num segundo momento, alcançado um grande número de bactérias, estas redirecionariam boa parte de seu aparato bioquímico, para a expressão de proteínas implicados diretamente no processo patogênico, levando a modificações no estado fisiológico do local atacado e proporcionando condições para que a bactéria continuasse seu crescimento (do 2º ao 14º dia).

Corroborando com esta teoria temos que talvez os genes nocauteados dos mutantes que tiveram grande perda de patogenicidade (análise fenotípica), e drásticas quedas de seu número dentro do hospedeiro (curvas *in vivo*), possam ser responsáveis pela síntese de proteínas com funções iniciais no processo patogênico (1ª etapa), enquanto que os genes nocauteados daqueles mutantes que apresentaram fortes queda de patogenicidade, mas que apresentaram pouca queda no número de bactérias no local atacado possam estar envolvidos na 2ª etapa.

Ainda em relação às curvas de crescimento *in vivo*, é importante salientar que mesmo nos pontos finais das curvas de crescimento *in vivo* daqueles mutantes que apresentaram as menores taxas de multiplicação no interior da planta (mutante 18A1, 33B11 e 29H9), não foi observado ou evidenciado uma queda no número do patógeno. Tal resultado pode significar que talvez a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, em condições inapropriadas, se utilize de uma via alternativa que possibilite sua sobrevivência, por longos períodos de tempo, no interior do hospedeiro, ou então, diferentemente do que foi descrito por GALI (1980) a *X. citri* deva formar esporos ou qualquer outra forma de estado dormente. Tal contestação evidencia o porquê da importância de uma área que tenha sido infectado com cancro cítrico tenha que permanecer sem o cultivo de citrus durante 2 anos.

5 CONCLUSÃO

5.1 - O presente trabalho demonstrou que a estratégia, de obtenção de mutantes por meio do complexo transposase/transposon EZ-TN5TM <KAN-2> Insertion é uma boa alternativa para o estudo do genoma funcional da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, tendo em vista que proporcionou a obtenção de um grande banco de mutantes, nas quais foram retirados os 53 mutantes analisados neste artigo. Além disso, esta técnica foi capaz de nocautear genes de forma aleatória e esparsa dentro do genoma bacteriano e produzir mutantes estáveis.

5.2 - A avaliação fenotípica é uma maneira rápida e precisa para a caracterização de mutantes, evidenciando muitas de suas características como sintomas, velocidade do processo patogênico, influência externas como temperatura e a fisiologia de dada espécie na qual foi inoculado. A avaliação fenotípica mostrou também que mudas de limão cravo (*Citrus limonia*) de 30 a 40 cm são mais resistentes quando comparadas a porta enxertos de laranja pêra-rio (*Citrus sinensis*), diferentemente do que é dito pela Fundecitrus que coloca o limão cravo como sendo mais suscetível a doença.

5.3 - As curvas de crescimento *in vitro* evidenciaram que o meio TS é rico o suficiente para suprir a grande maioria das deficiências dos mutantes, mas que também possa existir mutantes com genes envolvidos exclusivamente no processo patogênico.

5.4 - As curvas de crescimento *in vivo*, demonstrou o quanto cada mutante se desenvolve em relação a *X. citri* selvagem, bem como, não se pode correlacionar diretamente os sintomas com a capacidade do mutante em se multiplicar na planta, uma vez que ficou demonstrado que pode existir mutantes que apresentem um bom desenvolvimento na planta, mas que mostrem pouco ou nenhum sinal aparente de Cancro cítrico, ou então mutantes que apresentem aparentemente os mesmos sintomas mas que apresentem grandes discrepâncias quanto ao número de bactérias dentro da planta.

As curvas de crescimento revelaram ainda que possa existir um número mínimo de bactérias no local atacado para que se dê, de fato, o início do processo patogênico,

e que talvez a *X. citri* possua uma via alternativa, ou então, um estado de dormência que possibilite sua sobrevivência, por longos períodos de tempo, no interior do hospedeiro.

6 REFERÊNCIAS

- ALEGRIA, M. C. et al. New Protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. **Journal of bacteriology**, v. 186, p. 6186-6197, 2004.
- ALFANO, J. R.; COLLMER, A. The type (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 5655-5662, 1997.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- AMARAL, A. M. do. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado Técnico-Embrapa**, n. 86, Nov, 2003. Disponível em: <<http://www.cenargen.embrapa.br/publica/trabalhos/cot086.pdf>>. Acesso em: 26/06/2009.
- AMARAL, A. M. do. et al. Reação de acessos de citrus à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sob condições de casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, p. S284, 2003.
- AMORIM, L.; FILHO, A. B. A epidemiologia do cancro cítrico. 3º Encontro de Fitopatologia: Doenças de Fruteiras Tropicais. Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, p. 1-17, 1999.
- BADEL, L. J. et al. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* text it avrE1/hopM1 mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 2, p. 99–111, 2006.
- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICS, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v. 276, p. 726-733, 1997.

- BARBER, C. E. et al. A novel regulatory system required for Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 555-566, 1997.
- BASSANEZI, R. B. e LARANJEIRA, F. F. Spatial patterns of leprosis and its mite vector in commercial citrus groves in Brazil. **Plant Pathology**, v. 56, p. 97-106, 2007.
- BEHLAU, F. Epidemiologia do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) em laranja “pêra” (*Citrus sinensis*) sob condição de controle químico e cultural. Mestrado (Dissertação) em agronomia - Universidade de São Paulo - **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, Piracicaba, p. 101, 2006.
- BERGAMIN FILHO, A.; KINATI, H.; AMORIM, L. Cancro cítrico. **Manual de fitopatologia**, p. 327-329, 1995.
- BERGAMIN FILHO, T.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F.; GOTTFELD, T. R. Epidemiology of citrus canker in Brazil with and without the Asian citrus leafminer. In: **International Citrus Canker Research Workshop**, Proceeding, p. 20-22, 2000.
- BONAS, U.; ACKERVEKEN, G. V. Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? **The Plant Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 1997.
- BRADBURY, J. F. **Guide to plant Pathogenic Bacteria**. Slough: C.A.B. International, p. 332, 1993
- BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, v.292, p.2275-2278, 2001.
- BUEL, C. R. Genes involved in plant-pathogen interactions. Induced plant defenses against pathogens and herbivores. 2^a ed. APS PRESS. **The American Phytopathological Society**, St. Paul Minnesota, 1999.
- BURNS, D. L. Biochemistry of type IV secretion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 25-29, 1999.
- BUTTNER, D.; BONAS, U. Getting across - bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 5313-5322, 2002a.

BUTTNER, D.; BONAS, U. Port of entry - the type III secretion translocation. **Trends Microbiology**, v. 10, p. 186-192, 2002b.

CARVALHO, F. M. de S. **Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira**. 2006. 177f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão preto – FMRP/USP, Ribeirão Preto, 2006.

CHEN, G. Y.; ZOU, L. F.; WANG, X. P.; XIANG, Y.; WANG, J. S. Pathogenicity determinants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Chinese Agricultural Sciences**, v. 37, n. 9, p. 1301-1307, 2004.

CHOU, F. L. The *Xanthomonas campestris* gumD gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. **Biochemistry Biophysics Res. Commun.** San Diego, v.233, p.265-269, 1997.

CHRISTIE, P. J. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: A paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 3085-3094, 1997.

CHRISTIE, P. J.; VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends Microbiology**, v. 8, p. 354-360, 2000.

COHN, J.; SESSA, G.; MARTIN G.B. Innate immunity in plants. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 55-62, 2001.

CONAB. Companhia Nacional De Abastecimento. **Balanço do Agronegócio Brasileiro** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/indicadores/0205-balanca-exportacao.pdf>>. Acesso em: 25/08/2009.

CORBIN, D. R.; SAUER, N.; LAMB, C. J. Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 12, p. 4337-4344, 1987.

CORNELIS, G. R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 735-774, 2000.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Maryland USA: **American Society of Plants Physiologists**, p. 829-850, 2001

DIANESE, J. C.; SHAAD, N. W. Isolation and characterization of inner and outer membranes of *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. **Phytopathology**, v.72, p. 1284-1289, 1982.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*, v. 32, p. 479-501, 1994.

DOW, J. M.; DANIELS, M. J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, v. 17, p. 263-271, 2000.

DOW, J. M.; NEWMAN, N.; VON ROEPENACK, E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 241-261, 2000.

DUAN, Y. P.; CASTAÑEDA, A.; ZHAO, G.; ERDOS, G.; GABRIEL, D. W. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 12, n. 6, p. 556-560, 1999.

EISENREICH, W. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. **Chemistry Biology**, London, v.5, p.221-233, 1998.

EPICENTRE Biotechnologies. Disponível em:
<<http://www.epibio.com/item.asp?id=283>>. Acesso em: 26/06/2009.

FACINCANI, A. P. **Análise Proteômica do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2007. 154f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Planta) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FENSELAU, U.; BONAS, U. sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa and Fli secretion systems. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, p. 845-854, 1995.

FINNEGAN, D. J. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. **Trend Genetic**, v. 5, p. 107-109, 1989.

FLOR, H. H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology**, St Paul, v. 9, p. 275-?, 1971.

FUNDECITRUS. Fundo De Defesa Da Citricultura. Disponível em:

(a)<<http://www.fundecitrus.com.br>>

(b)<<http://www.fundecitrus.com.br/Pagina/Historico,46>>

(c)<<http://fundecitrus.com.br/doencas/campanha.html>>

(d)<<http://fundecitrus.com.br/doencas/cancro.html>>

(e)<http://fundecitrus.com.br/est_cancro_br.html> Acesso em: 25/07/2009.

GABRIEL, D. W. Why do pathogens carry avirulence genes? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 55, n. 4, p. 205-214, 1999.

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

GALLI, F. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2 - Doenças das plantas cultivadas. v. 14, p. 22-23, 325-328, 853-855, 1980.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. An overview of the road map to the manual. **Systematic Bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, p. 20, 2000.

GELVIN, S. B. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Molecular biology**, v. 51, p. 223-256, 2000.

- GORYSHIN, I, Y. et al. Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes. **Nat Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 97-100, Jan 2000.
- GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H. Compendium of citrus diseases (eds TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H.). **American Phytopathological Society**, p. 5-7, 2000.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ANCHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, St Paul, v. 82, n. 11, p. 1319-1325, 1992.
- GRAND, C.; SARNI, F.; LAMB, C. J. Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 169, n. 1, p. 73-77, 1987.
- GRAVENA, S. O cancro e a minadora. **Informativo Coopercitrus**, n. 141, v. 12, p. 18, 1998
- GUSTTINE, D. L. et al. Metabolites from pseudomonas-corrugata elicit phytoalexin biosynthesis in white clover. **Phytopathology**, v. 80, n. 12, p. 1427-1432, 1990.
- HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 641-679, 2000.
- HAMER, L.; DEZWAAN, T. M.; MONTENEGRO-CHAMORRO, M. V.; FRANK, S. A.; HAMER, J. E. Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 67-73, 2001.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, v. 21, p. 1102-1156, 2000.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistense gene-dependent plant defense responses. **Plant cell**, v. 8, p. 1773-1781, 1996.

- HARTUNG, J. T.; PRUVOST, O. P.; VILLEMONT, 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.
- HASSE, G. A Laranja no Brasil 1500-1987. São Paulo: **Duprat & Iobe Propaganda**, 296p, 1987.
- HASSE, C. H. *Pseudomonas citri*, the cause of citrus canker. **Journal Agricola Res.** v. 4, p. 97-100, 1915.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.) ***Xanthomonas***. London: Chapman & Hall, p. 1-17, 1993.
- HERBERS, K.; CONRADS-STRAUCH, J.; BONAS, U. Race-specificity of plant resistance to bacterial spot disease determined by repetitive motifs in a bacterial avirulence protein. **Nature**, London, v. 356, n. 6365, p. 172-174, 1992.
- HOLT III, B. F.; MACKEY, D.; DANGL, J. L. Recognition of pathogens by plants. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 10, n. 1, p. 0-7, 2000.
- HUANG, H. C.; LIN, R. H.; CHANG, C. J.; COLLMER, A.; DENG, W. L. The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpin_{pss} secretion that are arranged collinearly with *yersinia ysc* homologs. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, p. 733-746, 1995.
- HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 62, p. 379-433, 1998.
- HUTCHESON, S. W. The *hrp*-encoded protein export systems of *Pseudomonas syringae* and other plant pathogenic bacteria and their role in pathogenicity. In: **Plant-Microbe Interactions**, ed. Stacey, G.; Keen, N. T. v. 3, p. 145-179, 1997.
- JESUS JÚNIOR, W. C. et al. Injuries caused by citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella*) exacerbate citrus canker (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) infection. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n.3, p.277-283, 2006

- JUDSON, N.; MEKALANOS, J. J. TnAraOut, a transposon-based approach to identify and characterize essential bacterial genes. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 740-745, 2000.
- KATZEN, F. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.1607-1617, 1998.
- KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v. 24, p. 447-463, 1990.
- KEMP, B. P. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* gumD gene is essential for EPS production and pathogenicity and enhances epiphytic survival on cassava (*Manihot esculenta*) **Physiology Molecular Plant Pathology**, London, v.64, p.209-218, 2004.
- KHAN, L. D.; HINGORANI, M. K. Strain studies on *Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson . **Journal Hort. Science**, v. 45, p. 15-17, 1970.
- KOLLER, O. C. Citricultura: laranja, limão e tangerina. Porto Alegre: Editora **Rígel**, p. 446, 1994.
- LAIA, M. L. **Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* implicados na patogênese**. 2007. 322f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Planta) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- LEHOUX, D. E.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R. C. Discovering essential and infection-related genes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 515-519, 2001.
- LEVANO-GARCIA, J.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S; SILVA, A. C. R. da. Mapping transposon insertion sites by touchdown PCR and hybrid degenerate primers, **Biotechniques**, v. 28, n. 2, p. 225-229, 2005.
- LEYNS, F.; CLEENE, M. de; SWINGS, J.G.; LEY, J. de. The host range of genus *Xanthomonas*. **Botanical Review**, v.50, p. 308-356, 1984.

- LINDGREN, P. B. The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p. 129-152, 1997.
- MENDONÇA, V.M.; KLEPIN, H.D.; MATSON, S.W. DNA helicases in recombination and repair: construction of a Δ uvrD Δ helD Δ recQ mutant deficient in recombination and repair. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1326-1335, 1995.
- MOHL, D. A.; EASTER, J.; GOBER, J. W. The chromosome partitioning protein, ParB, is required for cytokinesis in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 741-755, 2001.
- MOREIRA, L. M. et al. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, p. 163-184, 2004.
- MORRIS, E. R.; REES, D. A.; YOUNG, G.; WALKINSHAW, M. D.; DARKE, A. Order disorder transition for bacterial polysaccharide in solution a role for polysaccharide conformation and recognition between *xanthomonas* and its plant-host. **Journal of Molecular Biology**, v.110, p.1-6, 1977.
- NAMEKATA, T., ROSSI, A. C., CERÁVOLO, L. C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja**, v. 17, n. 1, p. 67-78, 1996.
- NCBI. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 15/09/2009.
- NOUWEN, N. et al. Secretion PulD: Association with pilot PulS, structure, and ion-conducting channel formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 96, v. 14, p. 8173-8177, 1999.
- PADMANABHAM, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN, C. K. S. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Journal Phytopathology**, v. 26, p. 215-217, 1973.
- PETTERSSON, J. et al. Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. **Science**, v. 273, p. 1231-1123, 1996.
- PLANO, G. V.; DAY, J. B.; FERRACCI, F. Type III export: new uses for an old pathway. **Molecular of Microbiology**, v. 40, p. 284-293, 2001.

PLANT MANAGEMENT NETWORK international. Disponível em:
<<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker>> Acesso em:
25/08/2009

PUGSLEY, A. P. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. **Microbiology Review**, v. 57, p. 50-108, 1993.

QUIRINO, B. F.; BENT, A. F. Deciphering host resistance and pathogen virulence: the *Arabidopsis/Pseudomonas* interaction as a model. **Molecular Plant Pathology**, v.4, n. 6, p. 517-530, 2003.

RAHME, L. G.; MINDRINOS, M. N; PANOPOULOS, N. J. Plant and environmental sensory signals control the expression of hrp genes in *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 11, p. 3499-3507, 1992.

ROMEIRO, R. S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: Editora **UFV**, p. 279, 2001.

RAMIREZ, M. G. ; FUCIKOVSKY, L.; JIMENEZ, F. G.; QUITERO, R.; GALINDO, E. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 5-10, 1988.

ROSSETTI, V. V.; MULLER, G. W.; COSTA, A. S. Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus. **Fundação Cargill**, p. 84, 1993.

ROSSETTI, V. V. **Manual ilustrativo de doenças dos citrus**. FEALQ/FUNDECITROS, p. 207, 2001.

RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G., CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. Chapman and Hall, New York, p.193-264, 1993.

SALANOUBAT, M. et al. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, v. 415, p. 497-502, 2002

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infect. immun.**, v. 69, p. 3523-3535, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, R. A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHAAD, N. W. et al. 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. *aurantifolli* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *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. *alfalfa* (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**, v.28, n.6, p.494-518, 2005.

SCHAAD, N. W. et al. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006.

SHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. (Eds) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. **APS**: St. Paul, v. 3, p. 373, 2001.

SILVA, A. C. R. da. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, London, v. 417, n. 6887 p.459–463, 2002.

STAHL, E. A.; BISHOP, J. G. Molecular evidence for plant-pathogen arms races. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 3, n. 4, p. 299-304, 2000.

STASKAWICZ, B. J.; MUDGETT, M. B.; DANGL, J. L.; GALAN, J. E. Common and contrasting themes of plant and animal diseases. **Science**, v. 292, n. 5525, p. 2285-2289, Jun 2001.

SWARUP, S.; FEYER, R. da; BRLANSKY, R. H.; GABRIEL, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *Xanthomonas*

campestris to elicit canker like lesions on citrus. **Phytopathology**. St Paul, v. 81, n. 7, p. 802-809, 1991.

SWARUP, S.; YANG, Y.; KINGSLEY, M. T.; GABRIEL, D. W. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, pthA, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular Plant-microbe Interactions**. v. 5, p. 204-213, 1992

SWING, J. G., CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. **Chapman and Hall**, p. 228, 1993.

THANASSI, D. G.; HULTGREN, S. J. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 420-430, 2000.

THIEME, F. et al. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7254-7266, 2005.

TSUYUMU, S. et al. Factors involved in the pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. In: MILLS, D.; KUNEH, H.; KEEN, N. T. (Ed) **Molecular aspects of pathogenicity and resistance**: requirement for signal transduction. APS Press: St Paul, Minnesota, p. 105-113, 1996.

VAN GIJSEGEM, F. In plant regulation of phytopathogenic bacteria virulence genes: relevance of plant-derived signals. **European journal plant pathology**, v. 103, p. 291-301, 1997

VAN GIJSEGEM, F.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. **Trends in Microbiology**. v. 1, p. 175-180, 1993.

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

- VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. **Journal of Genetic Microbiology**, v.137, p. 1307-1316, 1996.
- WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annual Review Microbiology**, v.58, p.611-647, 2004.
- WEELS, J. M. et al. *Xylella fastidiosa* gen. Nov. gram negative xylem limited fastidious plant bacterial related to *Xanthomonas* spp. **International journal of systematic bacteriology**. v. 37, p. 136-143, 1987.
- WENGELNIK, K.; BONAS, U. HrpXv, na AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology**, n. 178, p. 3462-3469, 1996.
- WENGELNIK, K.; MAIE, C.; RUSSEL, M.; BOMAS, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 1061-1069, 1996.
- 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.
- WHALEN, M. C. Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Haubii 7998. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, London, v.6, p.616-627, 1993.
- WHITESIDE, J. O.; GARNSEY, S. M.; TIMMER, L. W. Plagas y enfermedades de los citricos. **The American Phytopathological Society**. México: Editora Mundi-Prensa. p. 5-7, 1996.
- WONG, S. M.; MEKALANOS, J. J. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 18, p. 10191-10196, 2000.

YANG, Y.; GABRIEL, D. W. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution o new host specificities. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 17, p. 4963-4968, 1995.

YANG, Y.; FEYTER, R.; GABRIEL, D. W. Host-specific symptoms and increased release of *Xanthomonas citri* and *X. campestris* pv. *malvacearum* from leaves are determined by the 102-bp tandem repeats of pthA and avrb6, respectively. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St paul, v. 7, n. 3, p. 345-455, 1994.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A - Laboratório de Plantas



1- Vista externa

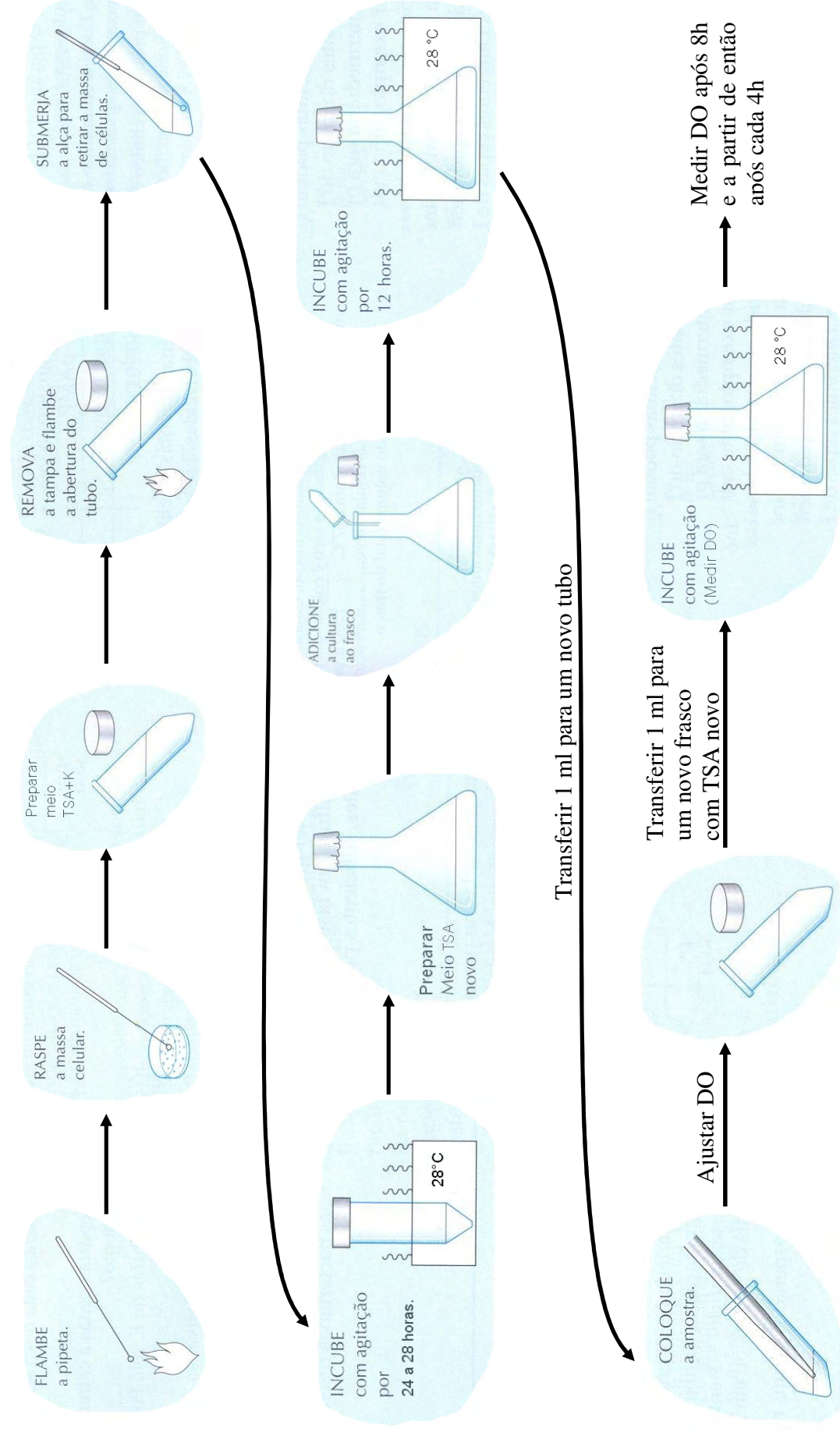


2- Vista interna



3- Vista interna mostrando parte do experimento de curva de crescimento *in vivo*

7.2 Anexo B - Curva de Crescimento *In Vitro*



7.3 Anexo C - Curva de Crescimento *In Vivo*



1 - Inoculação



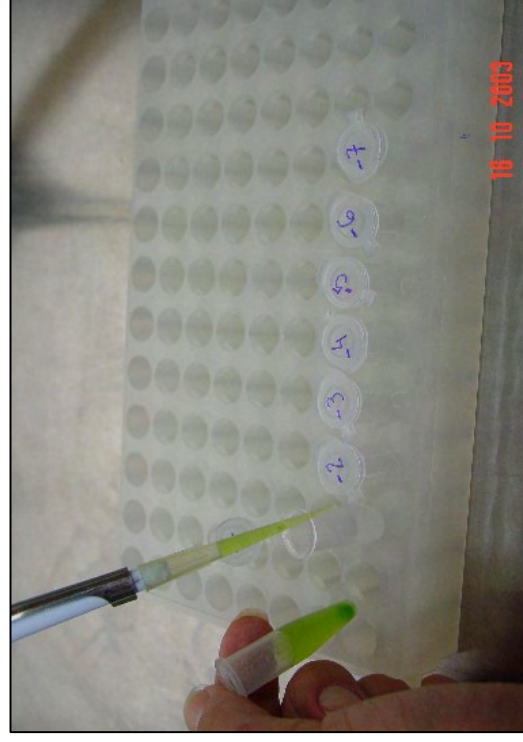
2- Retirada do disco



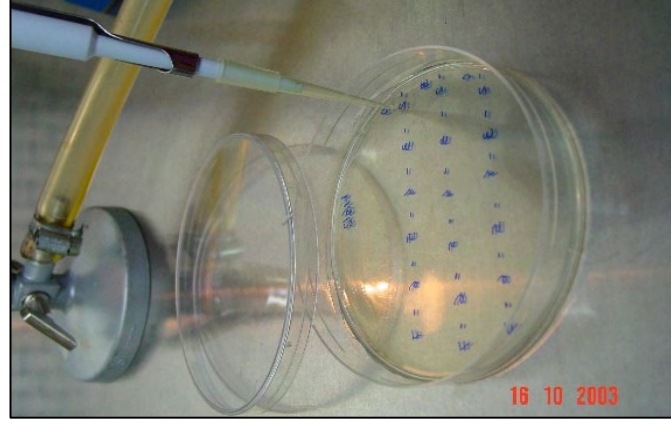
3- Descontaminação da área foliar



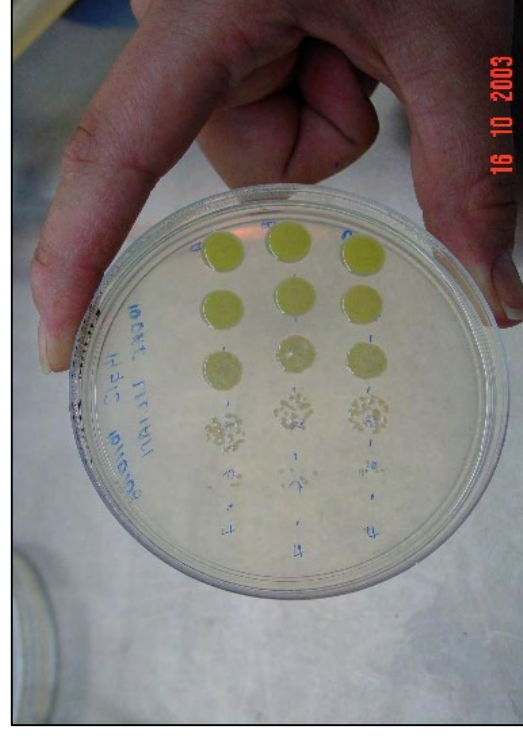
4- maceração



5- diluição seriada



6- Crescimento das microcolônias em placa.



7- Microcolônias após 2 dias de crescimento a 28°C, prontas para a contagem.