



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**HAYEN ALONSO**

**Caracterização do gene *phoP* (XAC4023) de  
*Xanthomonas citri subsp. citri* e sua relação com a  
divisão celular**



Rio Claro - SP  
2022

HAYEN ALONSO

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *PHOP* (XAC4023) DE  
*XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI* E SUA  
RELAÇÃO COM A DIVISÃO CELULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências - Câmpus de RioClaro, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Rio Claro - SP  
2022

A454c Alonso, Hayen  
Caracterização do gene *phoP* (XAC4023) de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e sua relação com a divisão celular / Hayen Alonso. -- Rio Claro, 2022  
38 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Henrique Ferreira

1. Cancro citrico. 2. Celulas Divisão. 3. Clonagem molecular.  
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

HAYEN ALONSO

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *PHOP* (XAC4023) DE  
*XANTHOMONAS CITRI* SUBSP. *CITRI* E SUA RELAÇÃO COM A  
DIVISÃO CELULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Henrique Ferreira

Prof. Dr<sup>a</sup>. Karen Cristiane Martinez de Moraes

Prof. Dr. Douglas Silva Domingues

Aprovado em: 16 de novembro de 2022



Assinatura do discente



Assinatura do(a) orientador(a)

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo nº 2020/02340-7.

Agradeço à minha família pelo amor, incentivo e apoio incondicional. À minha mãe e à minha avó por sempre estarem presentes e me apoiarem no desenvolvimento do meu TCC, sem elas com certeza a tarefa teria sido muito mais árdua.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Henrique Ferreira, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho. A todos do Laboratório de Genética de Bactérias (LGB), Caio, Giovani, Guilherme e Mateus, pelas assistências e pela companhia durante todo o processo. E principalmente aos meus amigos Natália e Mario, por me aguentarem fora do laboratório também.

Agradeço as minhas amigas, Juliana, Talita, Alicia, Iryna, Catarina e Desirée, com quem convivi ao longo desses anos de curso, que me lembram constantemente o que realmente importa na vida.

Agradeço a Gabs, que é a pessoa mais próxima e constante durante todos esses anos de curso, que me aguentou mais que qualquer um e ainda assim se manteve ao meu lado.

Agradeço a Kim Namjoon, Kim Seokjin, Min Yoongi, Jung Hoseok, Park Jimin, Kim Taehyung e Jung Jungkook, por servirem de fonte de inspiração e conforto, me ajudando a navegar um dia de cada vez.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação como bióloga, muito obrigada!

어두운 밤이 지나면 밝은 아침도 있듯이 알아서  
*Quando a noite escura passar, uma manhã brilhante virá*  
내일이 오면 밝은 빛이 비추니 걱정은 하지 말아줘  
*Quando o amanhã chegar, a luz brilhante irá brilhar, então não se preocupe*  
이건 정지가 아닌 니 삶을 쉬어가는 잠시 동안의 일시 정지  
*Isso não é um final, mas apenas uma pausa*  
엄지를 올리며 니 자신을 재생해 모두 보란 듯이  
*Levante o seu polegar e pressione play para que todos possam ver*

Tomorrow by 방탄소년단 (BTS)

## RESUMO

Segundo dados do IBGE, o estado de São Paulo é o maior produtor mundial de laranjas doce, sendo a maior parte da produção destinada à fabricação de suco. O cancro cítrico é uma das doenças bacterianas mais preocupantes para a citricultura no Brasil. A forma de cancro mais disseminada e severa, o cancro cítrico tipo A, é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). A caracterização de genes ainda desconhecidos, ou pouco estudados em *X. citri*, é importante para a identificação de alvos potenciais para compostos destinados ao controle do cancro cítrico. Neste trabalho caracterizamos o gene *phoP* deste fitopatógeno por meio da sua deleção em *X. citri* e mostramos como sua falta afeta a morfologia das células, incluindo a formação de filamentos e cadeias celulares. Avaliamos a formação do anel Z por meio do marcador fluorescente GFP-ZapA expresso no mutante *X. citri*  $\Delta$ *phoP*. Observamos no mutante que GFP-ZapA encontra-se espalhado por toda a célula, indicando que a ausência do gene *phoP* está associado com a formação do septo divisional. A coloração do nucleóide com DAPI mostrou que o material genético não estava localizado entre os septos, ou seja, a morfologia anômala das células mutantes não está associada com erros de segregação. O  $\Delta$ *phoP* também apresentou motilidade, formação de biofilme e produção de pectinase reduzidas, as quais podem estar relacionadas com a habilidade do patógeno de infectar seu hospedeiro. Os resultados obtidos com o  $\Delta$ *phoP* demonstram que o gene *phoP* está relacionado com a divisão celular, a morfologia e a patogenicidade de *X. citri*.

**Palavras-chave:** Anel Z; Cancro cítrico; Divisão celular; Gene *phoP*.

## ABSTRACT

According to data from IBGE, the state of São Paulo is the world's largest producer of sweet orange, with most of the production destined to the manufacture of juice. Citrus canker is one of the most threatening bacterial diseases for citrus in Brazil. The most widespread and severe form of canker, canker type A, is caused by the bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*). The characterization of genes still unknown, or with not enough studies in *X. citri*, is important for the identification of potential targets for compounds destined to control citrus canker. In this work, we characterized the *phoP* gene of this phytopathogen through its deletion in *X. citri* and showed how its absence affects cell morphology, including the formation of filaments and cell chains. We evaluated the formation of the Z ring using the fluorescent marker GFP-ZapA expressed in the mutant *X. citri*  $\Delta$ *phoP*. We observed in the mutant that GFP-ZapA is spread throughout the cell, indicating that the absence of the *phoP* gene is associated with the formation of the divisional septum. The staining of the nucleoid with DAPI showed that the genetic material was not located between the septa, in other words, the anomalous morphology of the mutant cells is not associated with segregation errors.  $\Delta$ *phoP* also showed reduced motility, biofilm formation and pectinase production, which maybe related to the pathogen's ability to infect its host. The results obtained with  $\Delta$ *phoP* demonstrate that the *phoP* gene is related to cell division, morphology and pathogenicity of *X. citri*.

**Keywords:** Cell division; Citrus canker; *PhoP* gene; Z ring.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO .....	9
2.1. Objetivos específicos .....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
3.1. Linhagens bacterianas e cultivo.....	10
3.2. Obtenção do mutante $\Delta phoP$ .....	11
3.3. Complementação do gene <i>phoP</i> .....	14
3.4. Curvas de crescimento .....	14
3.5. Microscopia.....	14
3.6. Teste de patogenicidade.....	15
3.7. Formação de biofilme .....	15
3.8. Teste de motilidade.....	15
3.9. Produção de enzimas extracelulares .....	16
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Obtenção do mutante $\Delta phoP$ e complementação .....	17
4.2. Mutante $\Delta phoP$ exibe crescimento normal.....	18
4.3. O mutante $\Delta phoP$ mostra forma celular anomala .....	19
4.4. O mutante $\Delta phoP$ mostra anomalias na formação do anel z.....	20
4.5. <i>PhoP</i> é necessário para a patogenicidade da <i>X. citri</i> .....	22
4.6. O mutante $\Delta phoP$ reduz a produção de biofilme e a motilidade em <i>X. citri</i> .....	23
4.7. Produção de enzimas extracelulares .....	25
5. DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira figura entre as maiores e mais rentáveis do mundo, sendo o Brasil o maior produtor mundial de laranjas doce, com 90% da sua produção destinada para exportação (USDA; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, 2019). Entretanto, as plantações de cítricos estão ameaçadas em larga escala por doenças como o greening (HLB) e o cancro cítrico, principalmente na região Sudeste, que é responsável por mais de 70% da produção de laranja do país (IBGE, 2016; Fundecitrus).

Em regiões tropicais e subtropicais, o cancro cítrico é uma das doenças bacterianas de citros mais preocupantes, pois causam sintomas nas folhas, caules e frutos, afetando diretamente a produção de cítricos (LANZA *et al.*, 2019). Embora houve ocorrência de formas de cancro cítrico mais brandas causadas por bactérias filogeneticamente próximas de *X. citri*, o cancro cítrico tipo A ou Asiático causado por *Xanthomonas citri* subsp. *citri* é a forma mais disseminada e prevalente hoje (GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002). As *Xanthomonas citri* subsp. *citri* são Proteobacterias Gram-negativas, aeróbicas obrigatórias, que têm morfologia de bastonetes, e apresentam um flagelo polar (DAS, 2003). Essa bactéria infecta a planta através dos estômatos e também por meio de lesões nos tecidos vegetais. A produção de biofilme em bactérias do gênero *Xanthomonas* é essencial para a sua sobrevivência durante a fase epifítica da doença e para a colonização dos tecidos da planta (RIGANO *et al.*, 2007). Além disto, fatores de virulência diversos como enzimas extracelulares e a produção de polissacarídeos contribuem para a infecção e proliferação em seus hospedeiros (WEI *et al.*, 2019).

*X. citri* teve seu genoma sequenciado em 2002 (DA SILVA *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2010), e diversos grupos de pesquisa têm se valido das informações do genoma para estudar genes desse patógeno que possivelmente estejam relacionados aos mecanismos de patogenicidade e interação bactéria-planta (LAIA *et al.*, 2009; DUNGER *et al.*, 2012; YAN; WANG, 2011; LI; WANG, 2014; WEI *et al.*, 2019). Entretanto, o conhecimento do genoma de *X. citri* permite também a caracterização de genes envolvidos em outros aspectos essenciais e pouco explorados da biologia dessa bactéria, como a divisão celular (MARTINS *et al.*, 2010; LORENZONI *et al.*, 2017; SAVIETTO *et al.*, 2018), e a segregação cromossômica (UCCI *et al.*, 2014; LACERDA *et al.*, 2017).

A divisão celular bacteriana é um processo essencial à vida. Ter

conhecimento sobre este processo é útil para a criação de métodos de controle do crescimento microbiano utilizando a maquinaria de divisão celular como alvo (LOCK; HARRY, 2008). Uma série de proteínas são essenciais para o processo de divisão celular. Dentre elas citamos Filamentous temperature-sensitive Z (FtsZ), a qual é codificada por um gene altamente conservado e presente na maioria das bactérias e Archaea (ERICKSON; ANDERSON; OSAWA, 2010). FtsZ é uma GTPase que se polimeriza formando hélices que se condensam para constituir um aparato de divisão em forma de anel (anel Z) ao redor do centro da célula (ERICKSON; ANDERSON; OSAWA, 2010; LUTKENHAUS, 2007). Sua função primordial é definir o plano de divisão e servir como arcabouço para a formação do septo, estrutura que contém todas as proteínas requeridas para que ocorra a citocinese. A reunião e o posicionamento desse anel são coordenados com a segregação do DNA e o alongamento da célula, garantindo células de tamanhos iguais cada qual com uma cópia do material genético (LEONARD; MØLLER-JENSEN; LÖWE, 2005; LUTKENHAUS, 2007).

Existem proteínas que estimulam e/ou modulam a formação e função do septo divisional como as Zaps (DURAND-HEREDIA *et al.*, 2012; DURAND-HEREDIA *et al.*, 2011; EBERSBACH *et al.*, 2008; GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002; MARTEYN *et al.*, 2014). A primeira a ser descrita, a proteína ZapA, interage diretamente com FtsZ, se ligando a ela e estimulando o agrupamento e estabilização dos seus protofilamentos (GUEIROS-FILHO; LOSICK, 2002).

O sistema de dois componentes (TCS) pertence à uma família de proteínas de transdução de sinal presentes principalmente em procariotos (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000). Em bactérias, os TCS são uma forma dominante de controle genético que responde a mudanças em seu ambiente e têm sido implicados na adaptação a uma variedade de condições de estresse (FREEMAN; DORUS; WATERFIELD, 2013; RAIVIO, 2014). Um TCS importante nos procariontes é o PhoP-PhoQ (GOULIAN, 2010). O PhoQ é uma histidina quinase (HK) ligada a membrana interna e responsável por detectar sinais ambientais, como peptídeos antimicrobianos, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, pH baixo, e assim ativar o outro componente do sistema PhoP-PhoQ, o PhoP (um regulador de resposta citosólico), por fosforilação (KATO; GROISMAN, 2004; PROST; MILLER, 2008).

A inativação desse sistema geralmente leva a uma atenuação da virulência bacteriana (ZWIR *et al.*, 2012; PEREZ *et al.* 2009; RAM; GOULIAN, 2013). Um estudo recente realizado por WEI *et al.* (2019), revelou que a deleção do gene *phoP* da estirpe chinesa (XH3) de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causou diminuição da mobilidade, formação de biofilme, bem como diminuição da produção de celulase, amilase e poligalacturonase. Além disso, a virulência em citros foi significativamente reduzida. Contudo, nada sobre a morfologia das células das estirpes mutantes foi citada neste estudo.

A caracterização de genes ainda não ou pouco estudados em *X. citri* é importante para a avaliação do potencial de novos compostos para controle do cancro cítrico, como tem sido feito em nosso grupo de pesquisa (KRÓL *et al.*, 2015; SAVIETTO *et al.*, 2018).

## 2. OBJETIVO

Caracterização do gene *phoP* de *X. citri* e sua influência na patogenicidade

### 2.1. Objetivos específicos

- Deletar o gene *phoP* do genoma de *X. citri*.
- Realizar complementação da linhagem mutante  $\Delta phoP$ .
- Avaliar a morfologia das estirpes selvagem, mutante  $\Delta phoP$  e linhagem complementada.
  - Observar a dinâmica do nucleóide em coloração com DAPI - permite estudar se a filamentação seria um erro de divisão, segregação ou ambos.
  - Efetuar testes de patogenicidade, de formação de biofilme, de motilidade, de produção de enzimas extracelulares e curvas de crescimento com as linhagens selvagem, mutante  $\Delta phoP$  e linhagem complementada.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Linhagens bacterianas e cultivo

Nesse estudo foi utilizada a linhagem selvagem do isolado 306 de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (IBSBF1594) (SCHAAD *et. al*, 2006). A *X. citri* e seus mutantes foram cultivados em meio de cultura YEB (10 g/L triptona, 5 g/L extrato de levedura, 5g/L NaCl, 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 5g/L sacarose, pH7.0) em temperatura de 29°C a 200 rpm, entre 24 e 48 horas, com adição de ágar (15g/L) se necessário. Para o cultivo da *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen) foi utilizado o meio LB (5 g•L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 10 g•L<sup>-1</sup> triptona, 10 g•L<sup>-1</sup> cloreto de sódio) a 37 °C (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Os antibióticos utilizados foram Kanamicina (20 µg•mL<sup>-1</sup>) e Gentamicina (20 µg•mL<sup>-1</sup>), aplicados em meios sólidos. As linhagens e plasmídeos utilizados no projeto estão listados na tabela 1.

**Tabela 1** - Linhagens e Plasmídeos utilizados no projeto.

<b>Linhagens e Plasmídios</b>	<b>Características relevantes</b>	<b>Origem</b>
<b><i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i></b>		
<i>X. citri</i> 306	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> linhagem 306 (linhagem selvagem), Ap <sup>R</sup>	(IBSBF1594)
$\Delta phoP$	Mutante <i>X. citri</i> com deleção do gene <i>phoP</i> (Localização no genoma: 4714904..4715587)	Este estudo
$\Delta phoP$ pLAC2- <i>pPhoP</i>	Mutante <i>X. citri</i> $\Delta phoP$ complementado com o vetor pLAC2- <i>phoP</i> ; Gen <sup>R</sup> ; Ap <sup>R</sup>	Este estudo
<b><i>E. coli</i></b>		
DH10B	Linhagem bacteriana de clonagem	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA
<b>Plasmídeos</b>		
pNPTS138	Gene <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> , plasmídeo suicida em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> ; km <sup>R</sup>	Bueno <i>et al.</i> (2021) e Prof. Lucy Shapiro (Universidade de Stanford, EUA)

pLAC2	<i>araC</i> , vetor replicativo em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> ; Gen <sup>R</sup>	(Lacerda <i>et al.</i> , 2017)
pGCD21 <i>zapA</i>	<i>gfp-zapA</i> , <i>araC</i> , Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , vetor integrativo em <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	B. Santos-H. Ferreira, não publicado

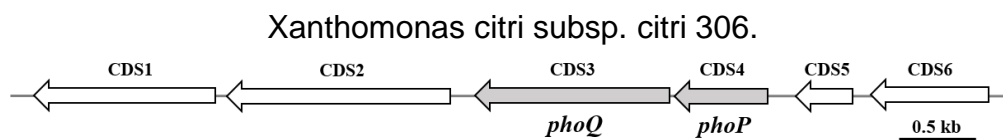
Linhagens de *E. coli* e *X. citri* utilizadas e plasmídeos, com características relevantes para o presente trabalho. Ap<sup>R</sup>, resistência a Ampicilina; Gen<sup>R</sup>, Resistência a Gentamicina; Km<sup>R</sup>, Resistência a Kanamicina; Δ denota deleção gênica.

Fonte: Dados da pesquisa.

### 3.2. Obtenção do mutante Δ*phoP*

A deleção do gene *phoP* foi realizada por troca alélica seguindo protocolo de Lacerda *et al.* (2017). Para tal, fragmentos *upstream* e *downstream* ao gene de interesse foram construídos por PCR e reunidos de tal forma que o fragmento resultante não portasse a sequência do gene *phoP* (coordenada genômica em *X. citri*: 4714904..4715587). A representação dos genes *phoP/phoQ* e seus contextos genômicos no genoma de *X. citri* 306 estão na figura 1 e na tabela 2. Os Primers utilizados na obtenção do fragmento para deleção do gene *phoP* estão listados na tabela 3 e a amplificação foi realizada com o Hi-Fidelity Pfu DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) seguindo recomendações do fabricante. Após amplificação, os fragmentos *upstream* e *downstream* foram digeridos com as enzimas *HindIII/PstI* e *PstI/BamHI*, respectivamente, e ligados ao vetor suicida pNPTS138 previamente digerido com as enzimas *HindIII* e *BamHI* utilizando T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, código EL0011). O plasmídeo final foi transformado em *E. coli* DH10B para seleção. Posteriormente, plasmídeos de 3 transformantes selecionados foram extraídos para averiguação por perfil de restrição e sequenciamento. O plasmídeo para deleção escolhido foi eletroporado em *X. citri* para o procedimento de deleção do gene de interesse (FERREIRA *et al.*, 1995). Em seguida, alíquotas de 100 µl foram espalhadas em placas com meio YEB com ágar, suplementado com kanamicina, para selecionar o primeiro evento de recombinação. As colônias resistentes ao antibiótico foram posicionadas em placas com meio YEB suplementado com sacarose (10%), para selecionar clones com o segundo evento recombinante. As deleções foram confirmadas por PCR Super Mix utilizando a reação da tabela 4.

**Figura 1** - Contexto genético do sistema de dois componentes *phoP-phoQ* de



Fonte: Dados da Pesquisa.

**Tabela 2** - Contexto genético do sistema de dois componentes *phoP-phoQ* de

*Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306.

CDS	Gene/bp	ID-Proteína	Nº de aminoácidos	Função prevista
CDS1	1203	XAC4020	400	Proteína hipotética conservada
CDS2	1566	XAC4021	521	Proteína hipotética conservada
CDS3	1416	XAC4022	471	Proteína sensora PhoQ do sistema de dois componentes
CDS4	671	XAC4023	277	Proteína regulatória PhoP do sistema de dois componentes
CDS5	360	XAC4024	119	Proteína hipotética conservada
CDS6	1005	XAC4025	334	Proteína hipotética conservada

Fonte: Dados da Pesquisa.

**Tabela 3** - Oligonucleotídeos utilizados nesse estudo.

Oligonucleotídeos	Sequência 5´- 3´	Bp amplificados
<b>Deleção do <i>phoP</i></b>		
A_ <i>phoP</i> _(4023)_HindIII_F	CGAAGCTTGAAGGCTTG CAATACCAGCA	
B_ <i>phoP</i> _(4023)_PstI_R	CGCTGCAGGCCTGCGC AAGAAACTCGAT	718
C_ <i>phoP</i> _(4023)_PstI_F	CGCTGCAGGCGTCGAC CGCAAAGCCTTC	678
D_ <i>phoP</i> _(4023)_BamHI_R	CGGGATCCGATCTGATC GGTATTCATTT	
<b>Complementação do gene</b>		
Comp_ <i>PhoP</i> _XbaI_F	CGTCTAGATCAGCCTTC GGTACGCGGAAT	684
Comp_ <i>PhoP</i> _NotI_R	CGGCGGCCGCATGCGT ATCCTTTTGGTCGAA	

Fonte: Dados da Pesquisa.

**Tabela 4** - Concentração e volume utilizado para cada reação com a polimerase PCR Super Mix.

<b>Componente</b>	<b>Quantidade por reação</b>
Água MiliQ autoclavada	Para completar 20 µl finais da reação
2X PCR SuperMix	Diluído para 1X (10 µl)
DNA molde	~20 ng
Primer A_phoP_(4023)_HindIII_F	1,0 µM
Primer D_phoP_(4023)_BamHI_R	1,0 µM
DMSO	3% (v/v)
Volume final	20 µl

Fonte: Dados da Pesquisa.

Para a amplificação dos fragmentos *upstream* e *downstream* (representados na Tabela 2), foi utilizado o termociclador Bio Rad modelo T100 e o ciclo de amplificação para cada uma das sequências esta na tabela 4.

**Tabela 5** - Ciclo de amplificação dos fragmentos *upstream* (U) e *downstream* (D) para deleção do gene *phoP*.

<b>Repetições</b>	<b>Etapa</b>	<b>Upstream</b>	<b>Downstream</b>	<b>U+D</b>
1	Desnaturação inicial	95° 2:30	95° 2:30	95° 2:30
35	Desnaturação	95° 0:30	95° 0:30	95° 0:30
	Hibridização	62° 0:30	62° 0:30	62° 0:30
	Extensão	72° 1:00	72° 1:00	72° 2:00
	Extensão final	72° 5:00	72° 5:00	72° 5:00

Fonte: Dados da pesquisa.

Técnicas estabelecidas de biologia molecular seguiram (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Extrações de DNA total de *X. citri* foram executadas com o kit Invisorb Spin Tissue Mini (Invitek, código 10321003). Extrações de DNA plasmidial foram realizadas com o kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, código K0502), e extrações de DNA do gel de agarose 0,7% foram realizadas com o kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, código K0691).

### 3.3. Complementação do gene *phoP*

Para a complementação do mutante  $\Delta phoP$ , a sequência ORF do gene *phoP* com a sequência promotora *araC* foram amplificadas por PCR utilizando a enzima Hi-Fidelity Pfu DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) e os primers Comp\_PhosphoP\_XbaI\_F e Comp\_PhosphoP\_NotI\_R designados na tabela 3. Após amplificação, o gene foi digerido com as enzimas XbaI e NotI, e ligado ao vetor replicativo pLAC2 previamente digerido com as mesmas enzimas. A construção foi transformada em *E. coli* DH10B para seleção e amplificação. Após seleção e sequenciamento, construção foi eletroporada em *X. citri*  $\Delta phoP$  para complementação.

### 3.4. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento foram feitas com base na metodologia descrita por Lacerda *et al.* (2017), onde três réplicas por mutante foram cultivadas em placas de 24 poços em meio YEB com volume total de 1.5 mL por poço e D.O. 600nm ~0.1 inicial. Cultivos foram realizados em leitor de placas Synergy H1N1 (BioTek), com medições de D.O. 600nm em intervalos de 30 min, por 48 horas. As etapas das curvas de crescimento foram elaboradas com o programa GraphPad Prism 6.

### 3.5. Microscopia

As linhagens de *X. citri* (selvagem, mutantes e complementadas) foram cultivadas em meio YEB a partir da D.O. 600nm ~0,1 a 30 °C. Ao atingirem a D.O. 600nm de ~0,4 as células foram imobilizadas em lâminas de agarose 0,9% como descrito por Martins *et al.* (2010) e visualizadas usando um microscópio Olympus BX-61 equipado com uma câmera monocromática Orca-Flash 2.8 (Hamamatsu). Para documentação e análise de dados foi utilizado o programa CellSens v.11 (Olympus). A coloração com 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) para observação do nucleóide bacteriano foi feita com base no protocolo de (TERASHIMA; KAMAGATA; KATO, 2020). As células das amostras observadas no microscópio (5  $\mu$ L) foram coradas com 30 minutos de antecedência utilizando os corantes DAPI e IP em concentração final de 10  $\mu$ g/mL. Para a observação do anel Z, foi utilizada a proteína

acessória de FtsZ GFP-ZapA, expressa pelo mutante *ΔphoP* a partir de plasmídeo integrativo pGCD21-zapA. A localização do septo divisional foi então observada por microscopia de fluorescência e de contraste de fase, anteriormente citadas.

### **3.6. Teste de patogenicidade**

Os testes de patogenicidade foram realizados conforme Calvaca *et al.* (2020). A planta hospedeira utilizada nos testes foi a laranja doce cultivar Natal [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], mantidas em casa de vegetação a 25-35 °C. As linhagens de *X. citri* foram cultivadas em meio YEB até D.O.600 nm de ~ 0,4 ( $10^8$  UFC / mL). As culturas de células foram diluídas 1000x em solução salina e inoculadas por infiltração na superfície abaxial das folhas usando seringas de 1 mL sem agulha. Os sintomas foram observados ao longo de 4 semanas.

### **3.7. Formação de biofilme**

Os testes de formação de biofilme foram realizados conforme Yan e Wang (2011), com modificações. Um pré-inóculo de 10 µL de cultura de células bacterianas com D.O. 600 nm de ~0,3 foi inoculado em placas de 24 poços contendo meio YEB por 96 horas em temperatura controlada de 29°C. O meio foi então descartado e os poços foram lavados com água destilada três vezes, para coloração destes com 0.1% (w / v) cristal violeta por 30 minutos. O excesso do composto de coloração foi descartado e os poços foram lavados novamente, seguido da adição de sulfóxido de dimetilo (DMSO) para dissolver o biofilme/células coradas. Foi utilizado o leitor de placas Synergy H1 (BioTek) para verificação da D.O. 600 nm de cada linhagem.

### **3.8. Teste de motilidade**

Os testes de motilidade foram realizados conforme descrito em Shen *et al.* (2001), com modificações. As linhagens foram cultivadas em meio YEB até atingirem D.O. 600nm de ~0.4 ( $10^8$  UFC / mL). Foram inoculados 2 µL das culturas de células de cada linhagem em placas com meio YEB + 0,3% de ágar e incubadas por 72

horas em temperatura controlada de 30°C. A motilidade foi avaliada medindo o diâmetro do círculo de crescimento ao redor do local de cada inoculação. Os testes foram repetidos três vezes e as linhagens examinadas em triplicatas.

### **3.9. Produção de enzimas extracelulares**

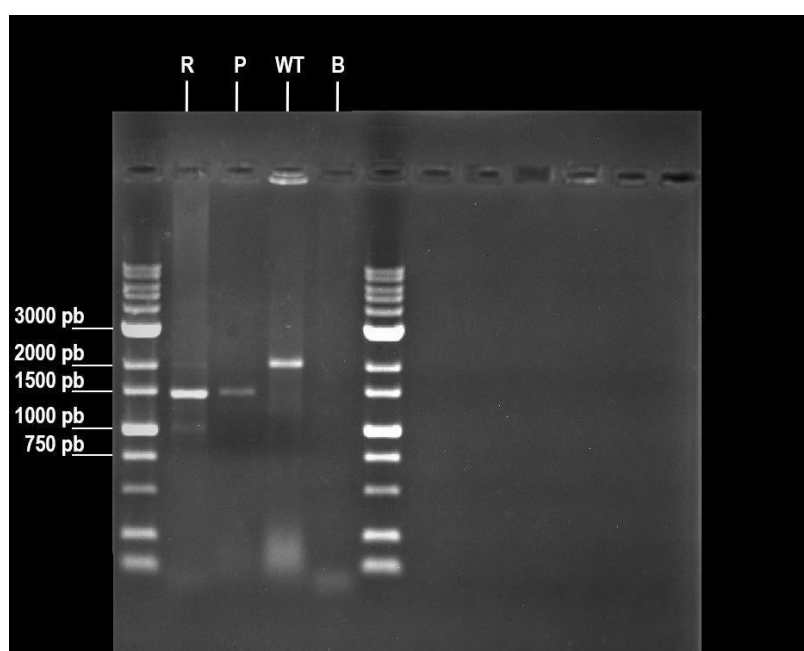
As atividades das enzimas amilase, celulase, pectinase e protease bacteriana foram analisadas em placas de teste de poligalacturonase (PG), celulase, ácido poligalacturônico e protease respectivamente, conforme descrito em Tang *et al.* (1991) com modificações. As placas foram inoculadas em meio YEB com 5 µL das culturas de células de cada linhagem e incubadas por 72 horas em temperatura controlada de 30°C.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtenção do mutante $\Delta phoP$ e complementação

A deleção do gene *phoP* de *X. citri* foi realizada por troca alélica e confirmada por eletroforese em gel de agarose (Figura 2). A reação de PCR para averiguação da deleção foi realizada com os primers A\_*phoP*\_(4023)\_HindIII\_F (718 pb) e D\_*phoP*\_(4023)\_BamHI\_R, que flanqueiam a região contendo o gene *phoP* a ser removido. O primeiro recombinante (R, integração do vetor para deleção por um único evento de *crossing-over*), apresentou duas bandas: uma de 1396 pb (referente a amplificação A-D da construção de deleção) e outra de 1908 pb (referente a amplificação A-D do cromossomo ainda contendo o gene *phoP*) (Figura 2). O mutante  $\Delta phoP$  (P) apresenta apenas a banda de 1396 pb. A ausência da banda de 1908pb neste mutante demonstra a ausência do gene *phoP* nesta linhagem. Enquanto que a linhagem selvagem (WT) apresentou apenas a banda de 1908 pb, mostrando a presença do gene *phoP*.

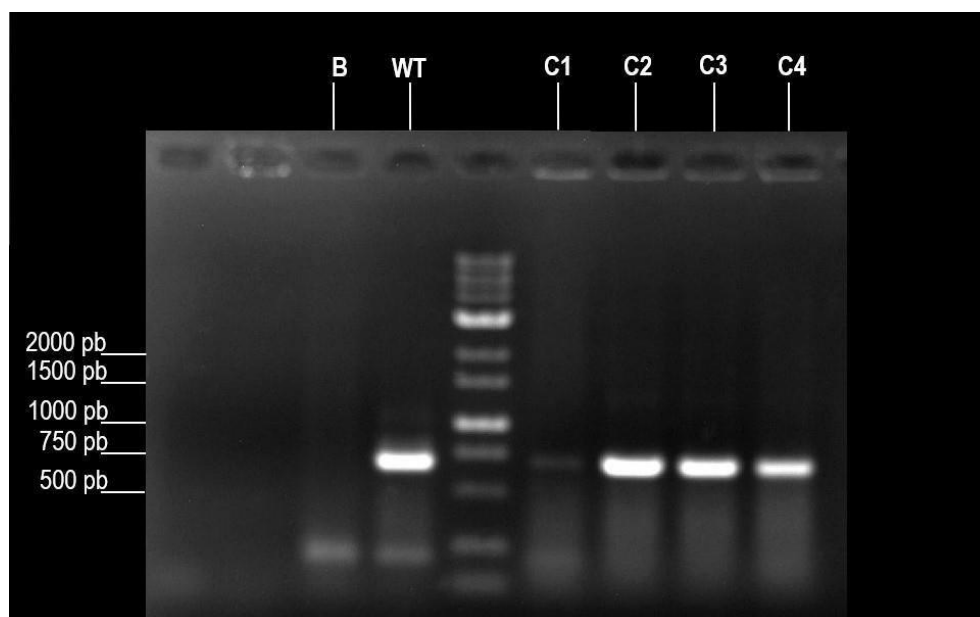
**Figura 2** - Gel de agarose mostrando os produtos de PCR do 1º recombinante (R); o mutante  $\Delta phoP$  (P), a linhagem selvagem (WT), o controle negativo, sem suspensão celular (B). PCR com os primers A e D para deleção de *phoP*. Marcador de peso molecular 1kb.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Para a complementação de *X. citri*  $\Delta phoP$ , introduziu-se o vetor pLAC2- *phoP* no mutante, seguindo-se a averiguação por PCR com os primers Comp\_PhoP\_XbaI\_F e Comp\_PhoP\_NotI\_R (Figura 3). Note a amplificação de fragmento de 684 pb, referente ao gene *phoP*, nas prováveis linhagens complementadas C1, C2, C3 e C4. Este fragmento de 684 pb também foi observado no controle positivo *X. citri* (WT). A efetividade biológica/fisiológica da complementação gênica de *phoP* foi comprovada nas sessões seguintes de microscopia e patogenicidade.

**Figura 3** - Gel de agarose dos produtos de PCR das linhagens complementadas (C1), (C2), (C3) e (C4); controle negativo (B) - sem suspensão celular; controle positivo *X. citri* (WT). Marcador de peso molecular de 1 kb.

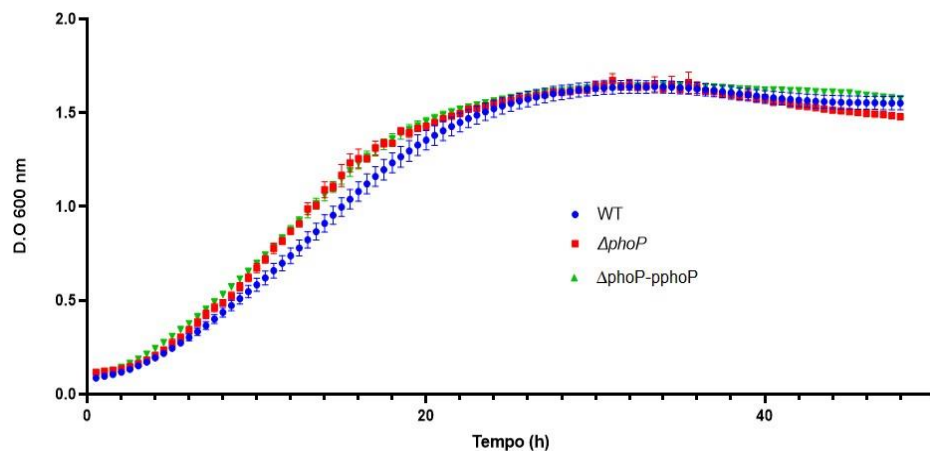


Fonte: Dados da Pesquisa.

#### 4.2. Mutante $\Delta phoP$ exibe crescimento normal

A deleção do gene *phoP* não afetou o crescimento do mutante, que apresenta perfil de crescimento em cultivo controlado semelhante a *X. citri* e da linhagem complementada. Para coletar os dados necessários, as três linhagens foram cultivadas e analisadas nas mesmas condições de cultivo, no mesmo período, diminuindo possíveis variáveis relevantes entre elas. Na figura 4, as três curvas são representadas em um gráfico para melhor visualização da similaridade entre elas.

**Figura 4** - Curvas de crescimento da linhagem selvagem de *X. citri*, mutantes  $\Delta phoP$  e linhagem complementada  $\Delta phoP$ -*pPhoP* em meio de cultura YEB. Os testes foram feitos em triplicatas. Cada ponto corresponde à média de 4 experimentos em dado tempo e a barra vertical representa o desvio padrão.



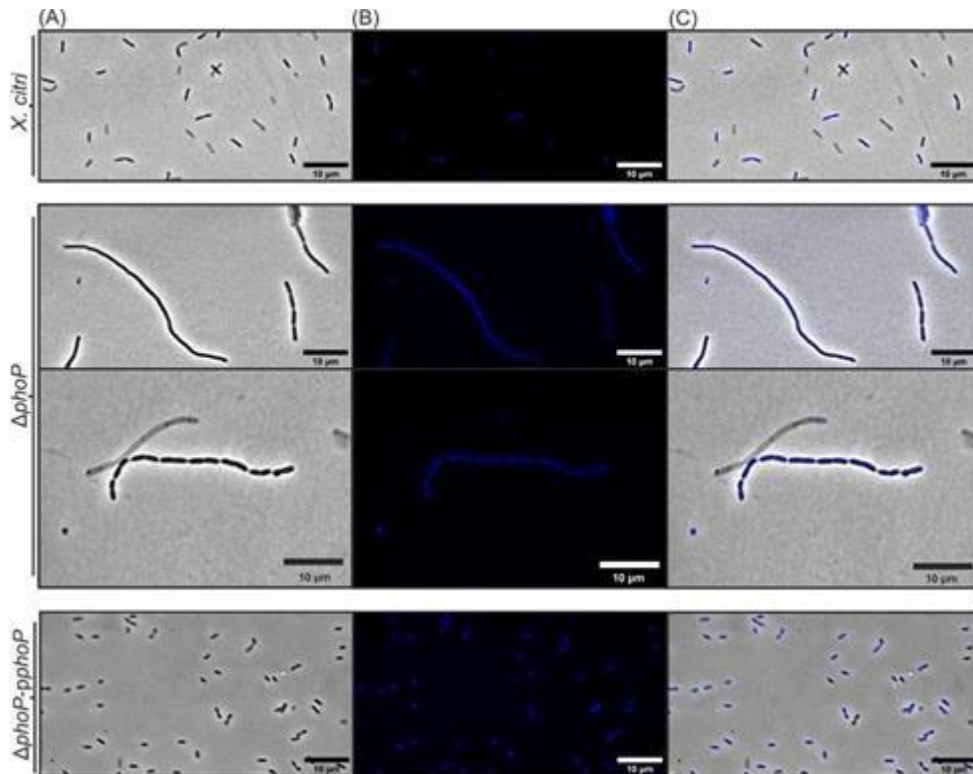
Fonte: Dados da Pesquisa.

### 4.3. O mutante $\Delta phoP$ mostra forma celular anômala

Ao avaliarmos os mutantes  $\Delta phoP$  em microscopia, observamos que as células apresentam tendência de filamentação e houve formação de cadeias celulares (células conectadas entre si) (Figura 5). As linhagens selvagem e complementada apresentam morfologia normal de bastonetes isolados, sem filamentação (Figura 5). As características observadas no  $\Delta phoP$  podem indicar erros no processo de divisão celular ou segregação cromossômica no mutante.

Mediante utilização do corante DAPI para visualização do nucleóide, não se observou evidências de erros no processo de segregação cromossômica. Aqui, o nucleóide bacteriano (artificialmente corado em azul) ocupa praticamente todo o espaço celular, mostrando morfologia bilobada, característica de células saudáveis (Figura 5-pranchas B-C). O mesmo perfil de distribuição foi observado nas cadeias de mutantes  $\Delta phoP$  (morfologia bilobada), que indica competência em segregação cromossômica (Figura 5-prancha B-C). Entretanto, filamentos do mutante  $\Delta phoP$  apresentaram nucleóide contínuo, que sugere erros de divisão tardios (Figura 5 B-C).

**Figura 5** - Fotos ilustrativas das linhagens selvagens (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*pPhoP*. Em (A) Microscopia de contraste de fase PhC; em (B) coloração DAPI e em (C) sobreposição de fase e DAPI. Escala: 10 $\mu$ m, no canto esquerdo inferior; Aumento 100x.



Fonte: Dados da Pesquisa.

#### 4.4. O mutante $\Delta phoP$ mostra anomalias na formação do anel z

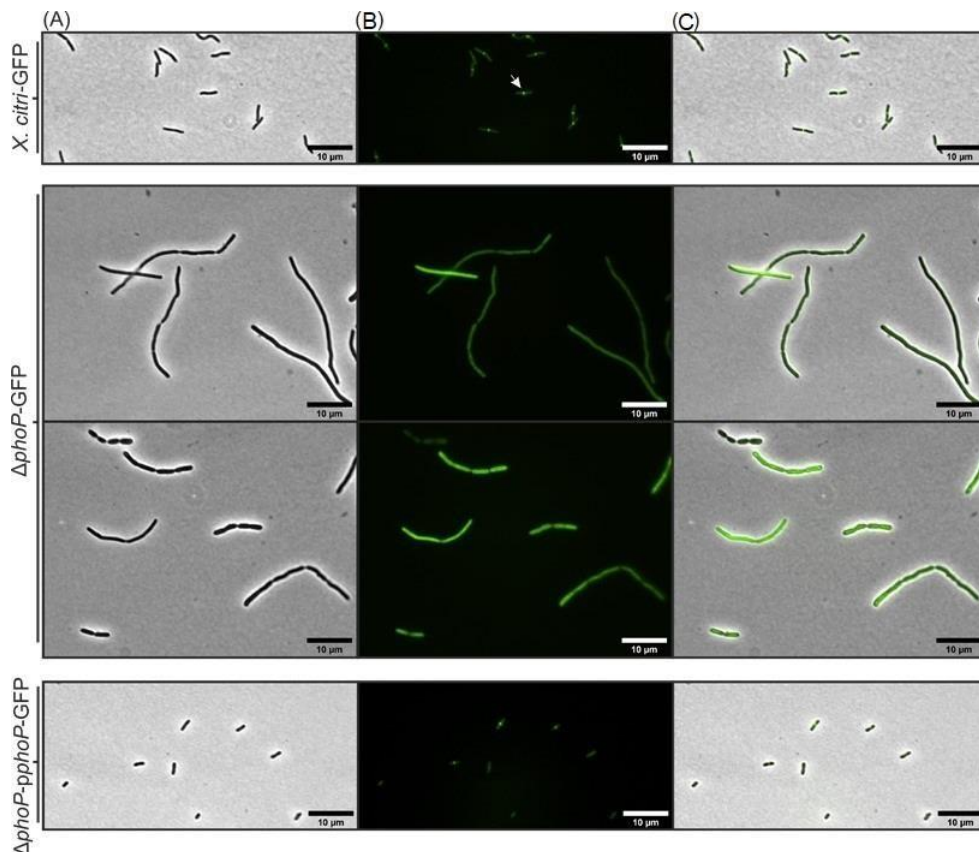
Ao avaliar em microscopia as linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*pPhoP* transformadas com vetor capaz de expressar o marcador de septo GFP-ZapA, observamos que a formação do septo divisional não estava ocorrendo no centro das células mutantes (Figura 6). A proteína ZapA participa na regulação da formação do anel Z, onde GFP-ZapA liga-se a FtsZ possibilitando a observação de uma barra fluorescente no centro divisional das células. Em testes com microscopia de fluorescência e contraste de fase do  $\Delta phoP$ , GFP-ZapA encontra-se dispersa por toda a célula, ao invés de concentrados no septo divisional (Figura 6D). No entanto, as células das linhagens *X. citri* e *X. citri*  $\Delta phoP$  amy::pGCD21 pLAC2-*pPhoP* apresentam o anel Z marcado pelo GFP-ZapA de

forma centralizada e não espalhada na célula. A tendência do mutante  $\Delta phoP$  em formar cadeias celulares e apresentar filimentação em suas células é provavelmente causada pela formação anômala do anel Z durante a separação das células filhas no processo de divisão celular.

A proteína PhoP é um regulador transcricional, e assim a ausência do gene *phoP* associada aos erros de formação do septo divisional indicam não somente que o sistema de dois componentes PhoP-PhoQ está relacionado com a divisão celular em *X. citri*, como indicam que os erros de formação do anel Z podem estar relacionados a interrupção ou estímulo da transcrição de alguma proteína importante à divisão celular.

**Figura 6** - Fotos ilustrativas das linhagens com construção GFP-ZapA selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*pphoP*. Em (A) Microscopia de contraste de fase PH100; (B) GFP e (C) sobreposição dos filtros PH100 e GFP.

Escala: 10 $\mu$ m, no canto inferior direito; Aumento 100x.

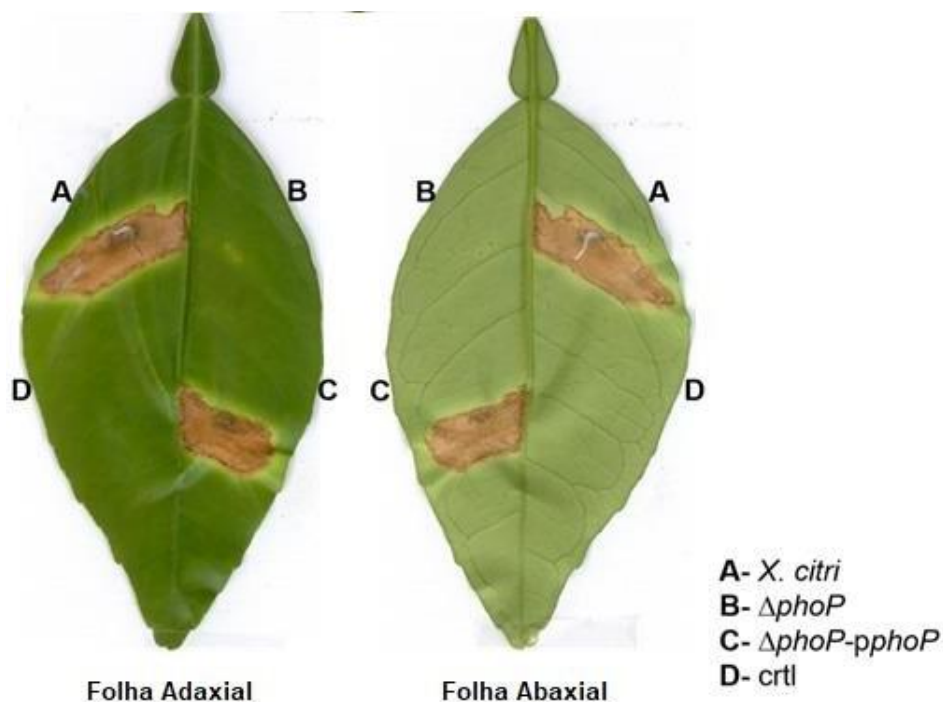


Fonte: Dados da Pesquisa.

#### 4.5. *PhoP* é necessário para a patogenicidade da *X. citri*

Como foi exposto acima, o gene *phoP* de *X. citri* parece estar relacionada com o processo de formação do anel Z na divisão celular. Sendo o processo de divisão vital, realizamos testes de patogenicidade com o mutante para verificar se há comprometimento da patogenicidade. Em teste de infiltração, *X. citri* (Figura 6, A) e linhagem complementada (6C) foram capazes de induzir sintomas de cancro cítrico. Entretanto,  $\Delta phoP$  não foi competente em indução de sintomas (6B). Esses resultados indicam que a falta do gene *phoP* interfere no processo de patogenicidade de *X. citri*.

**Figura 7** - Imagens ilustrativas do teste de patogenicidade após 30 dias, com um controle negativo (D) e as linhagens *X. citri* (A), mutante  $\Delta phoP$  (B) e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*pphoP* (C) em folhas de laranja doce Natal [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. As posições A e C apresentam lesões, em visível contraste com B (menos aparente) e D (sem lesões).

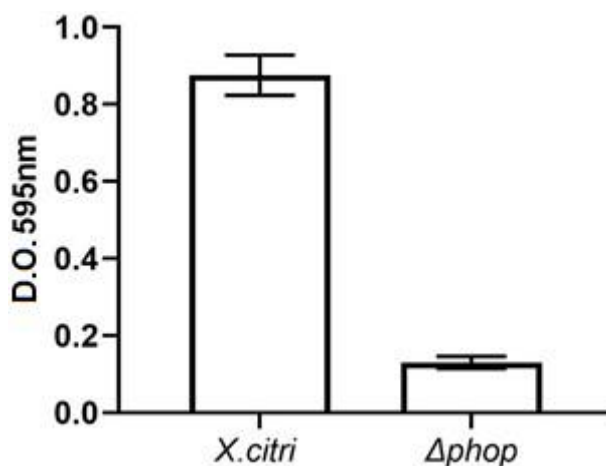


Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.6. O mutante $\Delta phoP$ reduz a produção de biofilme e a motilidade em *X. citri*

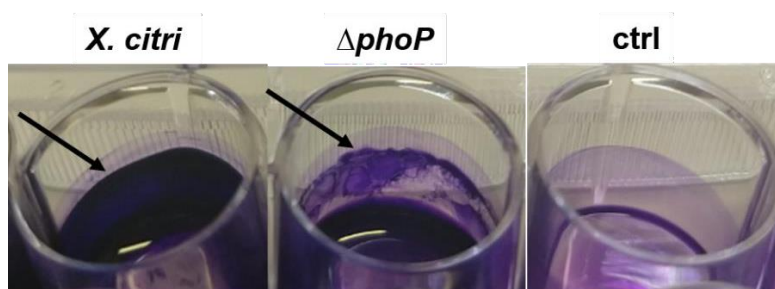
Com os testes de biofilme foi possível observar que, em placas de 24 poços, a sua produção pela *X. citri* foi afetada pela deleção do gene *phoP*. O mutante  $\Delta phoP$  apresentou uma redução na quantidade de biofilme produzido em comparação com a linhagem selvagem *X. citri* (Figuras 8, 9 e 10). O gráfico (Figura 8) mostra uma significativa diferença na D.O. 600 nm de cada amostra, e nas outras figuras (9 e 10) também é possível observar a diferença na coloração do crystal violeta entre as amostras. Esses resultados indicam que o gene *phoP* está relacionado com a regulação da formação de biofilme em *X. citri*.

**Figura 8** - Gráfico de barras representando a média das densidades óticas das 24 réplicas de *X. citri* e 24 réplicas de  $\Delta phoP$  dos testes de biofilme.



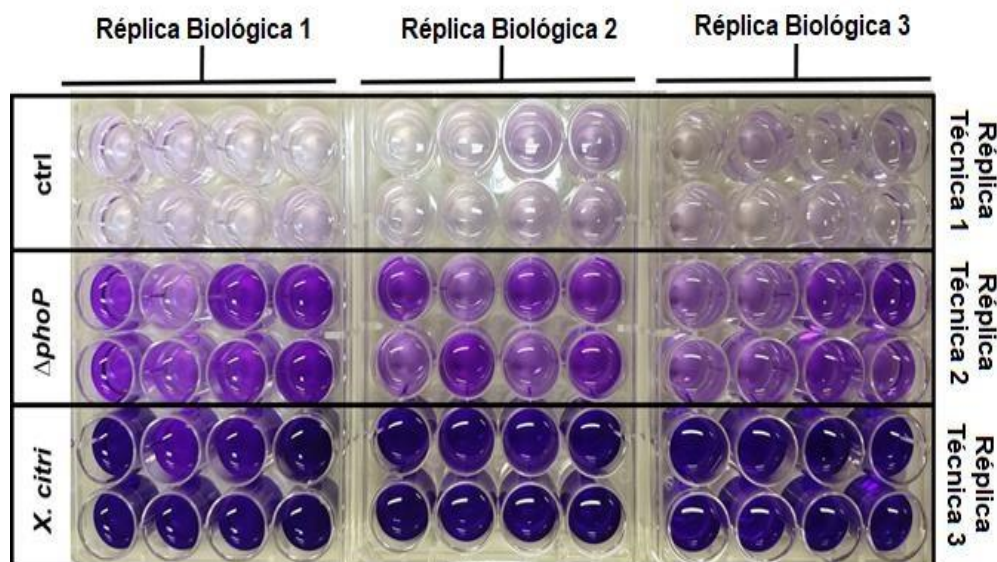
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 9** - Imagens ilustrativas ampliadas dos testes de biofilme (coloração violeta) realizados com as linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e o controle negativo (ctrl). Setas indicam a formação de biofilme em cada linhagem.



Fonte: Dados da pesquisa.

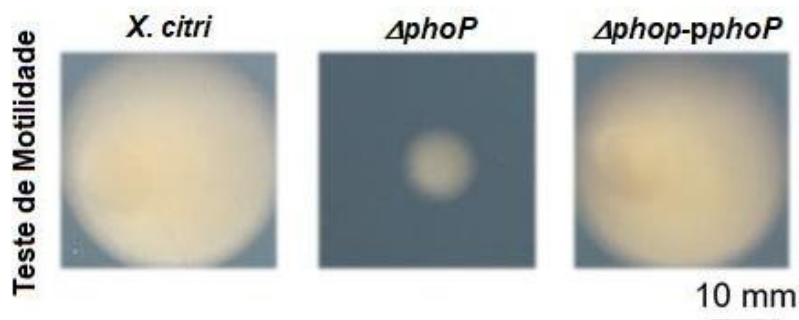
**Figura 10** - Imagens ilustrativas de três placas de 24 poços para os testes de biofilme (coloração violeta) realizados com as linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e o controle negativo (ctrl).



Fonte: Dados da pesquisa.

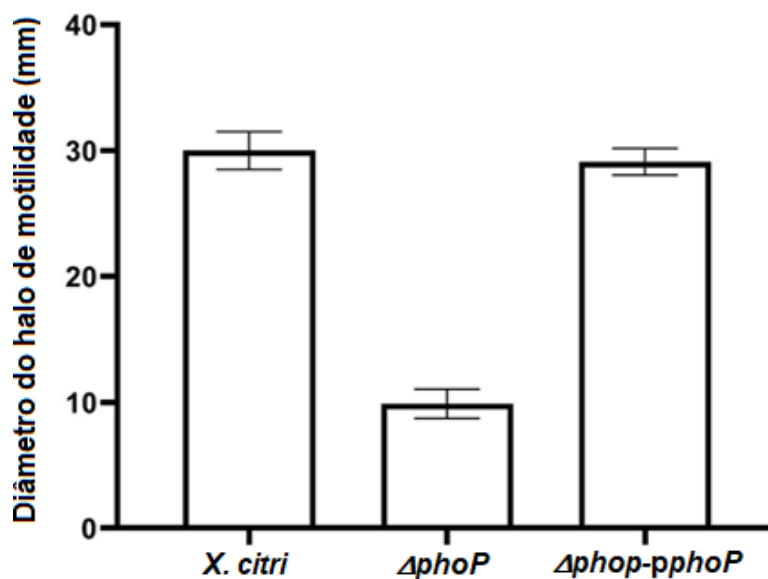
Como foi exposto nos testes de infiltração, o gene *phoP* de *X. citri* parece estar relacionado com a patogenicidade da bactéria, e sendo a motilidade um fator importante para a patogenicidade de *X. citri* subsp. *citri* (BOCK; PARKER; GOTTWALD, 2005; GOTTWALD; GRAHAM; SCHUBERT, 2002), realizamos testes com as linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*phoP*. Ao avaliar o tamanho das colônias obtidas nos testes de motilidade, observamos que o mutante  $\Delta phoP$  apresentou colônias com diâmetro menor que as linhagens selvagem e complementada (Figura 11), indicando que a motilidade foi afetada pela deleção do gene *phoP*. A figura 12 mostra gráfico de barras com médias dos diâmetros dos halos de motilidade obtidos. Os valores são expressos como médias  $n \pm DP$ , \*  $p < 0,05$ .

**Figura 11** - Imagens ilustrativas dos testes de motilidade realizados com as linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phop$  pLAC2-*pphoP*.



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 12** - Gráfico dos testes de motilidade realizados com as linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*pphoP*, comparando a média dos diâmetros dos halos de motilidade das colônias de cada uma das amostras.



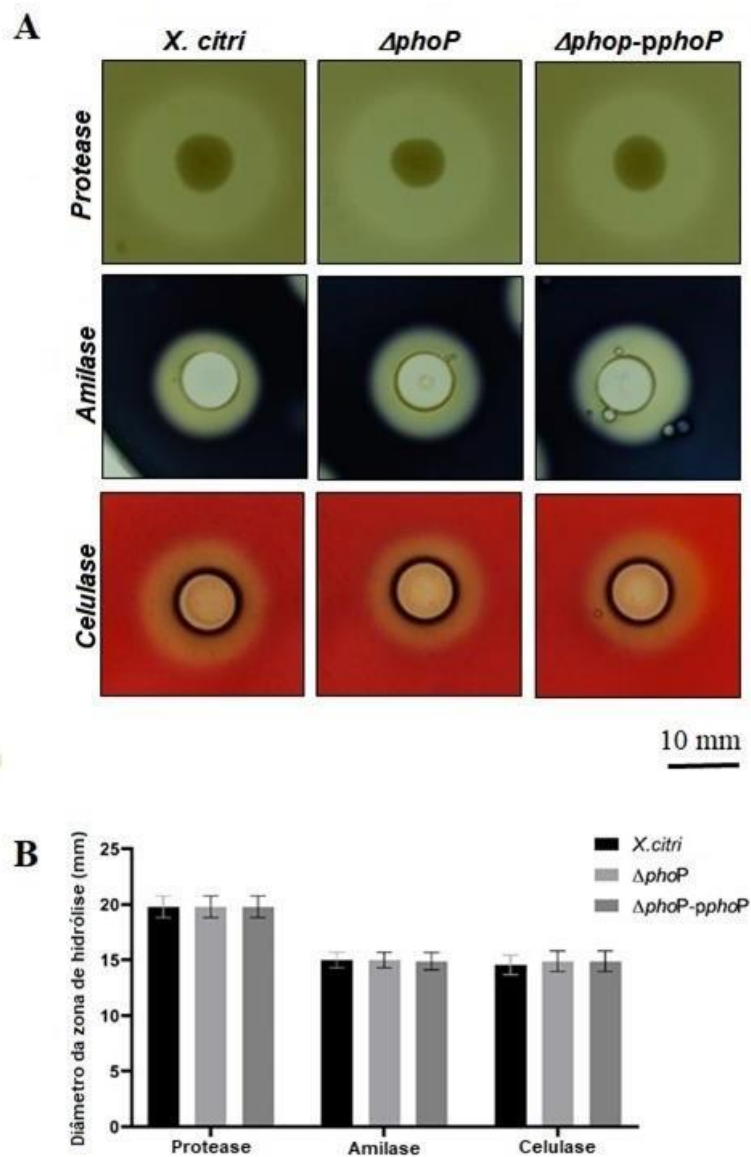
Fonte: Dados do pesquisador.

#### 4.7. Produção de enzimas extracelulares

A deleção do gene *phoP* não afetou a produção das enzimas da protease, amilase e celulase. A formação da zona de hidrólise das colônias das linhagens

selvagem de *X. citri*, mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*phoP* ocorre pela degradação dos compostos presentes em cada meio e pode ser visualmente observada por uma descoloração do meio ao redor das colônias (Figura 13A). A comparação dos diâmetros dessa zona pode ser observada no gráfico da Figura 13B, apresentando valores muito próximos.

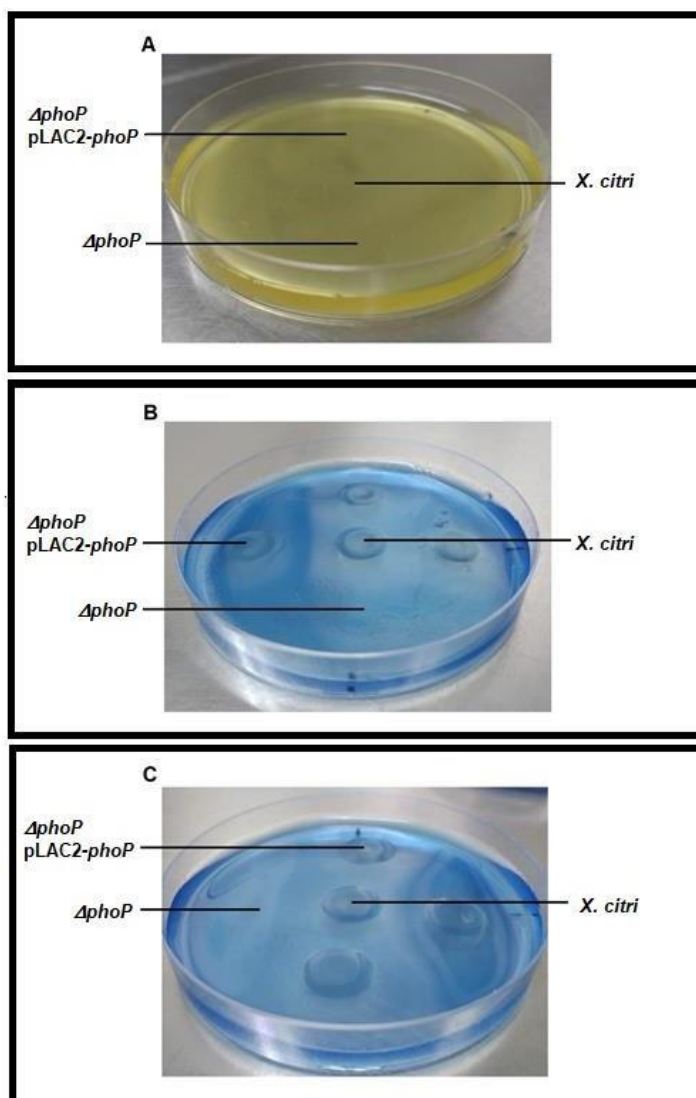
**Figura 13** - Imagens ilustrativas dos testes de protease, amilase e celulase realizados com as linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*pPhoP*. Em (A) imagens aumentadas da zona de hidrólise das colônias teste; Em (B) gráfico compara comparando as médias dos diâmetros da zona de hidrólise das colônias de cada uma das três enzimas.



Fonte: Dados da pesquisa.

Com o teste de produção da enzima da pectinase observamos que o mutante  $\Delta phoP$  não conseguiu degradar o ácido poligalacturônico, substrato da pectinase, presente no meio de cultura (Figura 14). As linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*phoP* não cresceram nos testes em pH 5 (Figura 14A), entretanto, somente o mutante não cresceu nos testes com pH 7 e 8 (Figuras 14B e 14C), indicando que o gene *phoP* pode estar relacionado com a produção de pectinases em *X. citri* subsp. *citri*.

**Figura 14** - Imagens ilustrativas dos testes de pectinase realizados com as linhagens selvagem (*X. citri*), mutante  $\Delta phoP$  e complementada  $\Delta phoP$  pLAC2-*phoP*. Em (A) o meio com pH 5; em (B) o meio com pH 7; em (C) o meio com pH



8.

Fonte: Dados da pesquisa.

## 5. DISCUSSÃO

O sistema de dois componentes PhoP-PhoQ foi estudado em diversas bactérias, e tem sido associado a patogenicidade das mesmas (BIJLSMA; GROISMAN, 2005; VENKATESH *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2019; SAYED *et al.*, 2021), além de pertencer à uma família de proteínas transdutoras de sinais que aumentam as chances de sobrevivência de bactérias sob condições extenuantes (GROISMAN, 2016). No presente trabalho, caracterizamos parcialmente a função do gene *phoP* em *X. citri*, como a sua deleção prejudica a virulência, a motilidade, a formação de biofilme e causa erros de divisão celular e morfologia. Analisamos a sua influência em patogenicidade vislumbrando definir um potencial alvo para o desenvolvimento de antibacterianos para controle do cancro cítrico, uma doença de grande impacto no mercado mundial de produtos cítricos (MARTINS *et al.*, 2020).

As curvas de crescimento populacional das linhagens mutante  $\Delta phoP$ , complementado  $\Delta phoP$  pLAC2-*phoP* e selvagem de *X. citri* mostraram-se semelhantes em meio YEB, assim como os resultados encontrados por Wei *et al.* (2019) nas linhagens de *X. citri* XHG3. Tal resultado indica que a deleção do gene *phoP* não alterou o crescimento/fitness de *X. citri*. A deleção do gene *phoP* no fitopatógeno *Erwinia chrysanthemi* também não alterou o seu crescimento, e o sistema de dois componentes PhoP-PhoQ dessa bactéria mostrou-se como um fator importante na patogenicidade dela (PALACIOS; SOLANILLA; PALENZUELA, 2005).

O TCS PhoP-PhoQ é um sistema conhecido por regular a virulência em bactérias, principalmente das Proteobactérias (OYSTON *et al.*, 2000; MINAGAWA *et al.*, 2003; GROISMAN *et al.*, 2013). Segundo WEI *et al.*, (2019), o sistema T3SS, importante para virulência da *Xanthomonas citri* subsp. *citri* XHG3, tem vários genes que são regulados pelo gene *phoP*, importantes para que ocorra a secreção de proteínas de virulência nas células vegetais. Testes de produção de enzimas extracelulares (protease, amilase, celulase e pectinase), foram realizados para comparar as diferenças entre a produção enzimática do mutante  $\Delta phoP$  e a linhagem selvagem. Ao contrário de Wei e colaboradores (2019), a produção de protease, amilase e celulase não apresentaram diferenças significativas entre as linhagens e a pectinase foi a única enzima que apresentou divergências entre elas. Em contraste com a *X. citri*, o mutante não cresceu em nenhum dos meios com o ácido poligalacturônico, indicando que a deleção do gene *phoP* debilitou a produção

de pectinase. Entretanto, os nossos testes de infiltração observaram diminuição drástica da patogenicidade em nosso mutante  $\Delta phoP$ , assim como o observado nas linhagens  $\Delta phoP$  de *X. citri* XHG3 de Wei *et al.*, (2019).

O desenvolvimento do cancro cítrico por *X. citri* precisa da formação de biofilme e de mobilidade para ocorrer de forma eficaz (RIGANO *et al.*, 2007; MALAMUD *et al.*, 2011). Em *X. campestris* subsp. *campestris*, o flagelo da bactéria é muito importante para a formação de biofilme (DOW *et al.*, 2003), e o gene *phoP* está relacionado com a regulação de 25 outros genes envolvidos na construção do flagelo na linhagem *X. citri* XHG3, e que apresentaram baixos níveis de expressão em sua linhagem mutante (WEI *et al.*, 2019). O mutante  $\Delta phoP$  da *X. citri* 306, assim como o mutante da *X. citri* XHG3, tiveram o biofilme e a motilidade reduzidos em comparação com suas linhagens selvagens, mostrando que a ausência da regulação feita pelo gene *phoP* pode ser responsável por essa redução.

Análises posteriores de microscopia mostraram que mutantes  $\Delta phoP$  tem células mais alongadas e inchadas, e também possuem tendência a filamentação e formação de cadeias celulares. Uma investigação do padrão de distribuição da massa cromossômica (nucleoide) mostra padrão bilobado, o que sugere segregação adequada dos cromossomos, mesmo nas cadeias dos mutantes  $\Delta phoP$ . Tal fato nos levou a sugerir que poderiam haver erros no processo de divisão tardia, que acumulados levariam à essa filamentação e desorganização tardia do nucleoide. Corroborando nossos resultados, um estudo em *Xanthomonas campestris* subsp. *campestris* detectou anormalidades na separação das células filhas de um mutante  $\Delta PhoPQ$  durante a divisão celular e foram relacionadas à uma formação irregular do anel Z. Tais resultados relacionaram o gene *phoP* com a regulação dos processos de distribuição de FtsZ durante a divisão celular (PENG *et al.*, 2017).

Para avaliar o efeito do gene *phoP* na formação do anel Z, expressamos o marcador de septo GFP-ZapA nas linhagens selvagem, mutante e complementada. Analisamos com microscopia fluorescente o septo divisional sendo formado no centro das células de *X. citri* e do complementado  $\Delta phoP$  pLAC2-*phoP*, entretanto o mutante  $\Delta phoP$  apresentou os sinais do marcador espalhados por toda a extensão de suas células, não sendo possível localizar o seu anel Z. Dessa forma, o gene *phoP* pode estar envolvido na regulação dos processos de distribuição de FtsZ durante a divisão celular de *X. citri* subsp. *citri*, assim como em *X. campestris* subsp. *campestris*.

Salientamos ainda que não existe nenhum dado publicado na literatura científica relacionando o sistema de dois componentes PhoP-PhoQ a defeitos na morfologia e divisão celular, tornando este estudo pioneiro.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos resultados associam o sistema PhoP-PhoQ com a regulação de processos de formação do anel Z, na formação de biofilme, na motilidade das células, na produção da enzima pectinase e na patogenicidade de *X. citri*. No entanto, o gene *phoP* não é necessário para o crescimento celular normal e nem para a produção de protease, amilase e celulase.

Este estudo representa a primeira evidência da influência do gene pleiotrópico *phoP* na morfologia e divisão celular em *Xanthomonas citri* subsp. *citri* e abre novas perspectivas no combate ao cancro de cítrico já que está diretamente associado a virulência deste fitopatógeno.

## REFERÊNCIAS

- BIJLSMA, J.J.E.; GROISMAN, E.A. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of *Salmonella enterica*. **Mol. Microbiol.** v. 57, p. 85–96, 2005.
- BOCK, C. H.; PARKER, P. E.; GOTTWALD, T. R. Effect of simulated wind-driven rain on duration and distance of dispersal of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from canker-infected citrus trees. **Plant Disease**, v. 89, n. 1, p. 71-80, 2005.
- BUENO D.; PEDROLI D.B.; MARTINS P.M.M. *et al.* Riboswitch theo/metE as a Transcription Regulation Tool for *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Microorganisms**, v. 9, n. 2: 329, 2021.
- CALVACA, L.; ZAMUNER, C.; SALDANHA, L. *et al.* Hexyl gallate for the control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp *citri*. **MicrobiologyOpen**, v. 9, n. 1104, 2020.
- DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C. *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, n. 6887, p. 459–463, 2002.
- DAS, A. K. Citrus canker - a review. **Journal of Applied Horticulture**, v. 5, n. 1, p. 52–60, 2003.
- DOW, J.M.; CROSSMAN, L.; FINDLAY, K. *et al.* Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell–cell signaling and is required for full virulence to plants. **National Academy of Sciences**, v. 100, n. 19, p. 10995–11000, 2003.
- DUNGER, G.; GAROFALO, C. G.; GOTTIG, N. *et al.* Analysis of three *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* effector proteins in pathogenicity and their interactions with host plant proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, n. 8, p. 865–876, 2012.
- DURAND-HEREDIA, J. *et al.* Identification of ZapD as a cell division factor that promotes the assembly of FtsZ in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, Washington, v.194, n. 12, p. 3189-3198, 2012.
- DURAND-HEREDIA, J. M. *et al.* Identification and characterization of ZapC, a stabilizer of the FtsZ ring in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 193, n. 6, p. 1405-1413, 2011.
- EBERSBACH, G. *et al.* Novel coiled-coil cell division factor ZapB stimulates Z ring assembly and cell division. **Molecular microbiology**, Salem, v. 68, n. 3, p. 720-735, 2008.
- ERICKSON, H. P.; ANDERSON, D. E.; OSAWA, M. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 74, n. 4, p. 504- 528, 2010.
- FERREIRA, H.; BARRIENTOS, F. J. A.; BALDINI, R. L.; *et al.* Electrotransformation

of three pathovars of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microb. and Biotechnol.**, v. 43, n. 4, p. 651- 655, 1995.

FREEMAN, Z. N.; DORUS, S.; WATERFIELD, N. R. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K<sup>+</sup> homeostasis and virulence. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 3, e1003201, 2013.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, J. H.; SCHUBERT, T. S. Citrus canker: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, v. 3, n. 1, 2002.

GOULIAN, M. Two-component signaling circuit structure and properties. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 184–189, 2010.

GROISMAN, E. A. Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 70, n. 1, p. 103–24, 2016.

GROISMAN, E. A.; K.HOLLANDS, M. A.; KRINER, E. J. *et al.* Bacterial Mg<sup>2+</sup> homeostasis, transport, and virulence. **Annu. Rev. Genet**, v. 47, n. 1, p. 625–646, 2013.

GUEIROS-FILHO, F. J.; LOSICK, R. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. **Genes & Development**, v. 16, n. 19, p. 2544- 2556, 2002.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia Estatística. **Produção Agrícola Municipal**, 2016. Acesso em: set de 2022.

KATO A.; GROISMAN, E. A. Connecting two-component regulatory systems by a protein that protects a response regulator from dephosphorylation by its cognate sensor. **Genes Development**, v. 18, n. 18, p. 2302–2313, 2004.

KRÓL, E.; DE SOUSA BORGES, A.; DA SILVA, I.; *et al.* Antibacterial activity of alkyl gallates is a combination of direct targeting of FtsZ and permeabilization of bacterial membranes. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 390, p. 1–12, 2015.

LACERDA, L. A.; CAVALCA, L. B.; MARTINS, P. M. M.; *et al.* Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Plasmid**, v. 90, p. 44–52, 2017.

LAIA, M. L.; MOREIRA, L. M.; DEZAJACOMO, J.; *et al.* New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2009.

LANZA, F. E.; MARTI, W.; SILVA, G. J. JR. *et al.* Characteristics of Citrus Canker Lesions Associated with Premature Drop of Sweet Orange Fruit. **Phytopathology**, v. 109, n. 1, p. 44-51, 2019.

LEONARD, T. A.; MØLLER-JENSEN, J.; LÖWE, J. Towards understanding the molecular basis of bacterial DNA segregation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, London, v. 360, n. 1455, p. 523-

535, 2005.

LI, J.; WANG, N. Foliar application of biofilm formation–inhibiting compounds enhances control of citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Phytopathology**, v. 104, n. 2, p. 134–142, 2014.

LOCK, R. L.; HARRY, E. J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 7, n. 4, p. 324-338, 2008.

LORENZONI, A. S. G.; DANTAS, G. C.; BERGSMA, T. *et al.* *Xanthomonas citri* MinC oscillates from pole to pole to ensure proper cell division and shape. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1352, p. 1–12, 2017.

LUTKENHAUS, J. Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 76, n. 1, p. 539-562, 2007.

MALAMUD, F.; TORRES, P.S.; ROESCHLIN, R. *et al.* The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 819–829, 2011.

MARTEYN, B. S. *et al.* ZapE is a novel cell division protein interacting with FtsZ and modulating the Z-ring dynamics. **mBio**, Washington, v. 5, n. 2, p. e00022-14, 2014.

MARTINS, P. M. M.; LAU, I. F.; BACCI, M. *et al.* Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: Targeting the division septum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 310, n. 1, p. 76–83, 2010.

MARTINS, P. M. M. *et al.* *Xanthomonas citri* subsp. *citri*: host interaction and control strategies. **Tropical Plant Pathology**, v. 45, n. 3, p. 213-236, 2020.

MINAGAWA, S.; OGASAWARA, H.; KATO, A. *et al.* Identification and molecular characterization of the Mg<sup>2+</sup> stimulon of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 13, p. 3696-3702, 2003.

MOREIRA, L. M.; ALMEIDA, N. F.; POTNIS, N. *et al.* Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 238, p. 1-25, 2010.

OYSTON, P. C.; N. DORRELL, K.; WILLIAMS, S. R. *et al.* The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 6, p. 3419–3425, 2000.

PALACIOS, A. L.; SOLANILLA, L. E.; PALENZUELA, P. R.. Role of the PhoP-PhoQ system in the virulence of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937: involvement in sensitivity to plant antimicrobial peptides, survival at acid pH, and regulation of pectolytic enzymes. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 6, p. 2157-2162, 2005.

PENG, B. Y.; PAN, Y.; LI, R. J. *et al.* An Essential Regulatory System Originating

from Polygenic Transcriptional Rewiring of PhoP-PhoQ of *Xanthomonas campestris*. **Genetics**, v. 206, n. 4, p. 2207–2223, 2017.

PEREZ, J. C.; SHIN, D.; ZWIR, I. *et al.* Evolution of a bacterial regulon controlling virulence and Mg<sup>2+</sup> homeostasis. **PLoS Genet**, v. 5, n. 3, p. 1-11, 2009.

PROST, L. R.; MILLER, S. I.. The Salmonellae PhoQ sensor: mechanisms of detection of phagosome signals. **Cell. Microbiol**, v. 10, n. 3, p. 576–582, 2008.

RAIVIO, T. L. Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 8, p. 1529–1541, 2014.

RAM, S.; GOULIAN, M. The architecture of a prototypical bacterial signaling circuit enables a single point mutation to confer novel network properties. **PLoS Genet**, v. 9, n. 8, p. 1-13, 2013.

RIGANO, L.A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R. *et al.* Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 10, p. 1222–1230, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAVIETTO, A.; POLAQUINI, C. R.; KOPACZ, M. *et al.* Antibacterial activity of monoacetylated alkyl 50 gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 6, p. 929–937, 2018.

SAYED, M. *et al.* Virulence and live vaccine potential of *Edwardsiella piscicida phoP* and *phoQ* mutants in catfish against edwardsiellosis. **Journal of Fish Diseases**. v. 44, n. 9, p. 1463-1474, 2021.

SCHAAD, N.W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G. *et al.* Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 8, p. 690-695, 2006.

SHEN, Y.; CHERN, M.; SILVA, F. *et al.* Isolation of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* FlagellarOperon Region and Molecular Characterization of *flhF*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 2, p. 204-213, 2001.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. L.; GOUDREAU, P.N. Two component signal transduction. **Annu. Rev. Biochem**, v. 69, p. 183–215, 2000.

TANG, J.L. *et al.* Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 226, n. 3, p. 409-417, 1991.

TERASHIMA, M.; KAMAGATA, Y.; KATO, S. Rapid enrichment and isolation of

polyphosphate-accumulating organisms through 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining with fluorescence-activated cell sorting (FACS). **Frontiers in microbiology**, v. 11, p.793, 2020.

UCCI, A.P.; MARTINS, P.M.M.; LAU, I.F. *et al.* Asymmetric chromosome segregation in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. **Microbiology Open**, v. 3, n. 1, p. 29–41, 2014.

USDA; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. Citrus: World Markets and Trade. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>> Acesso em out de 2022.

VENKATESH, B.; BABUJEE, L.; LIU, H. *et al.* The *Erwinia chrysanthemi* 3937 PhoQ sensor kinase regulates several virulence determinants. **J. Bacteriol**, v. 188, n. 8, p. 3088–3098, 2006.

WEI C.; DING T.; CHANG C. *et al.* Global Regulator PhoP is Necessary for Motility, Biofilm Formation, Exoenzyme Production, and Virulence of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* on Citrus Plants. **Genes**, v. 10, n. 5, p. 340, 2019.

YAN, Q.; WANG, N. High-throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, n. 1, p. 69–84, 2011.

ZWIR, I.; LATIFI, T.; PEREZ, J. C. *et al.* The promoter architectural landscape of the *Salmonella* PhoP regulon. **Mol. Microbiol**, v. 84, n. 3, p. 463–485, 2012.