UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Screening **de biblioteca de mutantes de** ***Xanthomonas citri*** **pv.** ***aurantifolii*** **patótipo C para genes relacionados àpatogenicidade e virulência.**

Felipe Pereira de Matos

Orientador(a): Jesus Aparecido Ferro
Co-orientador(a): Helen Alves Penha

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal - SP
Primeiro Semestre/2021

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

Screening **de biblioteca de mutantes de** ***Xanthomonas citri*** **pv.** ***aurantifolii*** **patótipo C para genes relacionados à patogenicidade e virulência.**

Felipe Pereira de Matos

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal - SP
1º Semestre de 2021

M433s

Matos, Felipe Pereira de

Screening de biblioteca de mutantes de Xanthomonas citri pv. aurantifolii patótipo C para genes relacionados à patogenicidade e virulência. / Felipe Pereira de Matos. -- Jaboticabal, 2021

42 p. : tabs., fotos, mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Jesus Aparecido Ferro

Coorientadora: Helen Alves Penha

1. Biologia. 2. Microbiologia. 3. Biotecnologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: TECNOLOGIA

CERTIFICADO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO : *Screening* de biblioteca de mutantes de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C para genes relacionados à patogenicidade e virulência.

ACADÊMICO: Felipe Pereira de Matos

CURSO: Ciências Biológicas

ORIENTADOR: Jesus Aparecido Ferro
CoORIENTADOR: Helen Alves Penha

Local de realização do TCC (Departamento, Faculdade, Instituição): Via Online

PERÍODO : Semestre Ano 6
Noturno 11

Aprovado com conceito: A [X] B [ ] C [ ]

Este trabalho é recomendado para compor a base de dados CAPELO. [X] Sim [ ] Não

Reprovado: [ ]

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)	(Assinaturas)
Presidente	Helen Alves Penha	Helen Alves Penha
Membro	Flávia Campos Freitas Vieira	Flavia C Freitas Vieira
Membro	Maria Heloísa Moreno Julião	MHMJulião

Jaboticabal 15 / 05 / 2021

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 15 / 07 / 2021
OU *Ad referendum*
Aprovado pelo TGRA-BIO em:...../...../.....

Luy Saran

Chefe do Departamento (ou TGRA-BIO*)

*Apenas nos casos em que o orientador e coorientador não pertencerem ao quadro de docentes da FCAV-UNESP

Scanned by CamScanner

DEDICO

Aos meus pais Rosangela Aparecida Porsani e Eduardo Pereira de Matos

Sou eternamente grato

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Eduardo Pereira de Matos e Rosangela Aparecida Porsani pelo apoio durante a graduação.

Agradeço imensamente à minha companheira Amanda Barbosa Garcia pelo apoio e auxílio para a conclusão deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela paciência, ensinamentos, correções e incentivo.

Agradeço imensamente à minha co-orientadora Drª Helen Alves Penha, pela oportunidade, pelos ensinamentos, empenho e dedicação para a realização deste trabalho.

À minha companheira de laboratório Iashilei Pasquini, que me ajudou em todas as fases deste trabalho e me ensinou muito sobre biologia molecular, meu sincero obrigado.

Aos amigos de laboratório, Luana, Wallyson, Maria Heloisa, Amanda.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas da FCAV que tive a sorte de ter, por todos os ensinamentos, tanto profissionais como pessoais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sumário

RESUMO v
ABSTRACT vi
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1. A Citricultura Brasileira 3
2.2. Doenças e pragas na citricultura Brasileira 3
2.3. O desenvolvimento das doenças de citros causadas por *Xanthomonas* 5
2.4. *Xanthomonas* causadoras do cancro e cancrose cítrica 7
2.5. Genética de *Xanthomonas citri pv. aurantifolii* patótipo C 9
2.6. Interação planta-patógeno 10
2.7. Biblioteca de mutantes 13
3. OBJETIVO 15
4. MATERIAL E MÉTODOS 15
4.1. Isolado bacteriano, meio de cultura e condições de cultivo 15
4.2. Teste de patogenicidade *in planta* 16
4.3. PCR inversa e sequenciamento 17
4.3.1. Extração de DNA total de XauC mutado 18
4.3.2. Digestão do DNA total dos mutantes 18
4.3.3. Ligação do DNA digerido dos mutantes 19
4.3.4. Amplificação dos fragmentos de DNA circularizados utilizando os oligonucleotídeos específicos para o transposon 19
4.3.5. Purificação por Fenol-Clorofórmio 20
5. RESULTADOS 21
5.1. Crescimento bacteriano *in vitro* e sintomas 21
5.2. Teste de Patogenicidade *in planta* 22
5.3. PCR inversa 25
5.4.1. Visualização do DNA em gel de agarose 27
5.4.2. Sequenciamento 27
6. DISCUSSÃO 29
7. CONCLUSÃO 31
8. REFERÊNCIAS: 32

RESUMO

O estudo dos genes em espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas* causadoras de doenças cítricas é imprescindível para compreender a biologia de interação destes patossistemas. A espécie *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C (XauC), causadora da cancrose tipo C, possui a capacidade de infectar apenas duas espécies de citros devido à variação no perfil de virulência e genes presentes em seu genoma, quando comparado com espécies mais agressivas. Poucos são os estudos sobre o papel dessas variações em XauC, que podem levar a uma melhor caracterização do patossistema *Xanthomonas*-Citros. Assim, a busca por novos genes relacionados à processos patogênicos desta bactéria foi realizada utilizando-se a abordagem de *screening* de uma biblioteca de mutantes por transposons (EZ-Tn5 System) de XauC. Duzentos e dezesseis mutantes foram inoculados na parte abaxial de folhas jovens de *Citrus aurantifolia* e os sintomas de cancrose foram acompanhados durante 25 dias. Oito mutantes apresentaram sintomas de cancrose alterados na primeira inoculação *in planta,* porém, em 3 repetições subsequentes, sete deles voltaram a apresentar sintomas clássicos de cancrose. O mutante *ΔXauC_P4G7* apresentou reprodutibilidade nos resultados e revelou ausência total dos sintomas clássicos de cancrose tipo C. Dessa forma, o mutante *ΔXauC_P4G7* pode estar relacionado a uma região do genoma envolvido no processo de patogenicidade de XauC, apesar de não ter sido possível identificar a região mutada.

Palavras-chave: Cancrose tipo C, Citricultura, Transposon.

ABSTRACT

The study of genes in bacteria of the genus *Xanthomonas* that cause citrus diseases is essential to understand the biology of interaction of these pathosystems. The species *Xanthomonas citri pv. aurantifolii* pathotype C (XauC), which causes type C canker, have the ability to infect only two citrus species due to the virulence variation profile and genes present in its genome, when compared to more aggressive species. There are few studies on the role of these variations in XauC, which can lead to a better characterization of the Xanthomonas-Citrus pathosystem. Thus, the identification of new genes related to the pathogenic processes of this bacterium was carried out using the screening approach of a mutant library by transposons (EZ-Tn5 System) from XauC. Two hundred and sixteen mutants were inoculated in the abaxial part of Citrus aurantifolia young leaves and the cancrose symptoms were evaluated for 25 days. Eight mutants showed altered cancer symptoms in the first inoculation *in planta*, however, in subsequent inoculations, seven of them returned to classic canker symptoms. The mutant, *ΔXauC_P4G7,* showed reproducibility in the results and revealed a total absence of type C canker classic symptoms, relating a genomic region to XauC pathogenic processes. These results contribute to a better understanding of the XauC-citrus interaction biology.

Keywords: Canker c type, Citriculture, Transposon

1. INTRODUÇÃO

A citricultura brasileira é responsável por grande parte da produção agrícola do país: o PIB do setor foi de US$ 6,5 bilhões em 2017 e gerou um total de 45 mil empregos no Brasil (NEVES et al., 2017). Entretanto, como qualquer cultura agrícola, é suscetível à diversas pragas. A segunda doença que mais acomete a produção citrícola é o cancro cítrico, ocasionada por bactérias do gênero *Xanthomonas,* a qual foi responsável pela perda de um milhão e oitocentos mil caixas de frutos durante a última safra (FUNDECITRUS, 2020).

De acordo com o agente etiológico e o grau de agressividade, o cancro cítrico pode ser classificado em três grupos: cancro cítrico tipo A e cancroses dos tipos B e C. O tipo A, que tem como agente causador a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xac), é a forma mais agressiva entre os três grupos, afetando todos os citros comercialmente relevantes e levando à grandes perdas econômicas. Os tipos B e C, causados por *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo B (XauB) e *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C (XauC), respectivamente, se manifestam de forma menos agressiva, e seus agentes etiológicos afetam menos espécies cítricas (FONSECA et al., 2019), sendo que o patótipo B, foi possivelmente erradicado (Chiesa et al., 2013).

Esse estudo tem como objeto a XauC a qual, atualmente, continua limitada ao estado de São Paulo, e possui sintomas muito semelhantes ao cancro cítrico quando infectam a lima ácida ‘Galego’ (*C. aurantifolia*) e o citrumelo ‘Swingle’ (*C. paradise* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) (JACIANI, 2012; JALAN et al, 2014).

Morfologicamente, XauC é uma bactéria gram-negativa que possui flagelo, formato de haste, apresenta colônias com coloração amarelada devido à presença de xantomonadina, e aspecto mucóide devido à produção de goma xantana (DESTÉFANO & RODRIGUES NETO, 2001; SCHAAD et al., 2006).

A dispersão da XauC, assim como da Xac e XauB, ocorre por vento e chuva, bem como o maquinário da lavoura e as roupas utilizadas, inoculando a própria árvore, e/ou árvores vizinhas. Uma vez sobre a planta, a bactéria penetra nos tecidos jovens através dos estômatos, hidatódios ou por ferimentos em tecidos maduros (BROWN, 2001). Os sintomas podem ser verificados nas folhas, ramos e frutos, sendo eles lesões circulares, eruptivas, corticosas com coloração parda e na periferia um halo amarelo (KOLLER et al., 1993; AMORIM

& BERGAMIN FILHO, 1999). O Cancro pode resultar em intensa desfolhagem e queda dos frutos. Não há medidas de controle capazes de eliminar completamente o cancro causado por Xac. Não existe cura para as plantas quando infectadas, , e a eliminação da Xac de uma área exige a erradicação das plantas doentes e das demais suspeitas de contaminação, ocasionando perdas na produção e dificultando o controle da doença, sendo necessário um profundo entendimento entre a interação planta-patógeno para conseguir uma resolução do problema (FUNDECITRUS, 2021).

A análise dos genomas de XauC e outras *Xanthomonas* revelou que XauC não possui diversos genes-chave dos processos de patogenicidade e virulência presentes em Xac. Esta diferença pode explicar a predominância de Xac nos cultivares de citros, assim como a maior agressividade comparada às espécies causadoras da cancrose tipo B e C (FONSECA et al., 2019). Muitos genes de XauC não possuem sua função definida pelos estudos, ainda, poucos foram analisados quanto à possível relação com processos patogênicos. Dos 4463 genes revelados no sequenciamento de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C ICPB 10535 (MOREIRA et al., 2010), sabemos pouco sobre quais estão relacionados ao processo infeccioso no hospedeiro.

A ausência de informação demonstra a importância de estudos realizados com essa bactéria, uma vez que o montante de estudos sobre XauC é menor e a chave para o controle do cancro pode estar no entendimento dos genes relacionados à patogenicidade dessa espécie, além disso Xauc tem grande similaridade com a Xac, mas com um número de hospedeiros reduzido.

Assim, é de grande relevância científica a identificação de genes envolvidos no processo de patogenicidade de XauC. Neste contexto, uma das ferramentas que possibilita a análise funcional em larga escala desses genes é a construção de uma biblioteca de mutantes através da inserção aleatória de um transposon no genoma bacteriano e *screening* destes mutantes por inoculação em folhas de espécies hospedeiras. Foi analisada, no presente trabalho, uma biblioteca de mutantes de XauC, cepa ICPB 10535 em folhas de espécie susceptível, visando encontrar genes potencialmente envolvidos em processos de patogenicidade e/ou virulência em XauC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Citricultura Brasileira

A citricultura é uma das mais importantes atividades do setor agrícola brasileiro. A laranja encontrou no Brasil condições ideais para se desenvolver, possibilitando a expansão por todo o território nacional (NEVES et al., 2010). A citricultura brasileira é responsável por grande parte da economia agrícola do país: o PIB do setor foi de US$ 6,5 bilhões em 2017 (NEVES et al., 2017). Em São Paulo gerou um total de 48.196 admissões em 2019, o que representa 26,17% das vagas geradas no estado (184,1 mil) e 7,48% do total brasileiro (644 mil) **(**BRASIL, SÃO PAULO, Secretaria do Trabalho).

Com uma produção de 385 milhões de caixas de laranjas colhidas em 2019, a secretária de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, destaca que o Brasil se destaca como o maior produtor e exportador de suco de laranja no mundo**,** responsável por 35% da produção de fruta e 75% de suco da produção global.

2.2. Doenças e pragas na citricultura Brasileira

A cultura citrícola, como qualquer cultura agrícola, possui empecilhos envolvendo pragas, doenças e problemas climáticos que limitam a expansão da cultura e afetam tanto a quantidade quanto a qualidade da produção. Os citros são susceptíveis à diversas pragas e doenças, como o amarelão dos citros (HLB ou *Greening*), a larva minadora de citros (*Phyllocnistis citrella*), cigarrinhas do citros (*Acrogonia gracilis*), entre outros. Uma das doenças que mais acomete a produção citrícola é o cancro cítrico, ocasionada por bactérias do gênero *Xanthomonas* (GRAHAM et al., 2004).

O combate ao cancro cítrico no Brasil foi subsidiado por normas jurídicas em forma de resoluções, as ações governamentais tem como objetivo garantir o cumprimento das legislações federais e estaduais específicas para o controle do cancro cítrico e do Decreto Estadual 45.211, de 19/09/2000, viabilizando a sustentabilidade econômica da citricultura no Estado através do controle desta doença, a Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA/SP) alterou os critérios relacionados à erradicação do cancro cítrico.

Primeiramente foi aprovada, em 25/06/2009, a Resolução SAA 43 determinando que sua Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA) promova a erradicação de plantas contaminadas, e das suspeitas de contaminação, baseada na Portaria 291, de 23/07/1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essa Portaria 291 descreve quatro ações, descritas abaixo, e é válida em todo território nacional:

> 1: *eliminação da planta ou plantas contaminadas e das demais contidas num raio mínimo de 30 metros, consideradas suspeitas de contaminação*;
> 2: *eliminação da planta ou plantas contaminadas e poda drástica das demais contidas num raio mínimo de 30 metros, consideradas suspeitas de contaminação*;
> 3: *eliminação da planta ou plantas contaminadas e desfolha química das demais contidas num raio mínimo de 30 metros, consideradas suspeitas de contaminação*;
> 4: *poda drástica da(s) planta(s) contaminada(s) e pulverização no raio peri-focal mínimo de 30 metros com calda cúprica na concentração de 0,1% de cobre metálico; repetir a pulverização a cada brotação nova.*

Após a divulgação da Resolução SAA 43/2009 também foi aprovada a Portaria CDA 11/2009, a qual revogou simultaneamente a Portaria CDA 28/2007 e a Resolução CEE-CANECC/SP 01/2000. Anteriormente à essas alterações realizadas pela SAA, a eliminação de todas as plantas dos talhões comerciais infestados com cancro cítrico era obrigatória, quando a incidência de plantas sintomáticas detectadas era superior a 0,5%, como determinado na Resolução CEE-CANECC/SP 01/2000. Para incidências iguais ou menores que 0,5%, apenas as plantas sintomáticas detectadas, e as demais contidas num raio mínimo de trinta metros, eram eliminadas. Anteriormente a essa metodologia (0,5%), já se aplicava o Método 1 descrito na Portaria 291/1997 que voltou a vigorar em São Paulo em 2009 quando da aprovação da Portaria CDA 11/2009. Em 2017 foi aprovada a Resolução SAA-10 que oficializada todo o território do Estado de São Paulo como área sob Sistema de Mitigação de Risco (SMR), relativo à praga do cancro cítrico, e tem como objetivo reduzir o potencial de inoculo visando à proteção de áreas ainda sem a ocorrência da praga cancro cítrico, permitir o trânsito de frutos cítricos oriundos de áreas de ocorrência da praga cancro cítrico, permitir a exportação de frutos cítricos oriundos de áreas de ocorrência da praga cancro cítrico para países que reconheçam o SMR como medida fitossanitária, o Artigo 4º define que: Todo produtor que explore

propriedade comercial de citros no Estado de São Paulo deverá promover, no mínimo, 1 (uma) vistoria trimestral em todas as plantas de citros da propriedade, com o objetivo de identificar as plantas que apresentem sintomas do cancro cítrico visando embasar ações de Defesa Sanitária no Estado de São Paulo (BRASIL, SÃO PAULO, Secretaria de Agricultura e Abastecimento).

2.3. O desenvolvimento das doenças de citros causadas por *Xanthomonas*

O ciclo das doenças causadas em citros por bactérias do gênero *Xanthomonas* – Cancro e Cancrose - é composto por quatro fases (Figura 1), que estão relacionadas à disseminação da bactéria no pomar, aos danos às plantas e a continuidade da doença na área. As sucessivas fases do ciclo do cancro cítrico e suas principais características são:

DISSEMINAÇÃO: consiste no trânsito da bactéria de uma lesão previamente formada até plantas sadias ou até partes sadias de uma planta anteriormente afetada. Pode ocorrer por ação de chuvas, por intermédio do homem, de máquinas, ferramentas, equipamentos, mudas, material de colheita e vestuário infestados. O cancro e cancrose não é disseminado por insetos (apesar das lesões ocasionados pelos mesmos facilitar a entrada da bactéria). Nessa fase, o fator ambiental mais importante é a água, que serve como veículo para a bactéria. A disseminação por respingos de água da chuva ocorre, principalmente, na própria planta e naquelas que estão ao redor. No entanto, quando as chuvas são acompanhadas de ventos a bactéria pode ser transportada por alguns quilômetros a partir da árvore afetada (FUNDECITRUS, 2020).

INFECÇÃO: ocorre quando a bactéria penetra na planta por aberturas naturais, como os estômatos, ou por ferimentos causados por equipamentos, atrito entre partes da própria planta. A existência de ferimentos aumenta significativamente as chances de infecção. A presença de água na superfície da planta para onde a bactéria foi disseminada é o fator ambiental essencial para o sucesso da infecção (FUNDECITRUS, 2020).

COLONIZAÇÃO: consiste no início da doença. É nesta fase em que os sintomas aparecem. O cancro e cancrose não são doenças sistêmicas. As bactérias se

multiplicam localmente apenas no ponto que penetram no tecido vegetal vivo, de onde liberam enzimas que degradam as células das plantas para obtenção de nutrientes. O rompimento das células da planta confere aspecto encharcado e escurecido ao tecido vegetal afetado. Este processo provoca a morte de células e a formação de lesões necróticas. As bactérias continuam o processo de colonização radialmente a partir do ponto de penetração e permanecem ativas nas margens das lesões. O fator ambiental mais importante nesta fase é a temperatura. A faixa mais favorável para a multiplicação da bactéria é de 25ºC a 35ºC, condição encontrada em várias regiões do país (FUNDECITRUS, 2020).

SOBREVIVÊNCIA: lesões remanescentes de cancro e cancrose existentes na planta de um ano para outro são a principal forma de continuidade da bactéria no pomar. Quando ocorre o molhamento das lesões, a bactéria nada para o filme de água na superfície da planta de onde pode ser disseminada e reiniciar o ciclo da doença. A bactéria não possui plantas hospedeiras alternativas aos citros, não possui estruturas especializadas de sobrevivência, como esporos, tampouco sobrevive em insetos, o que diminui seu potencial de sobrevivência fora da planta (FUNDECITRUS, 2020).

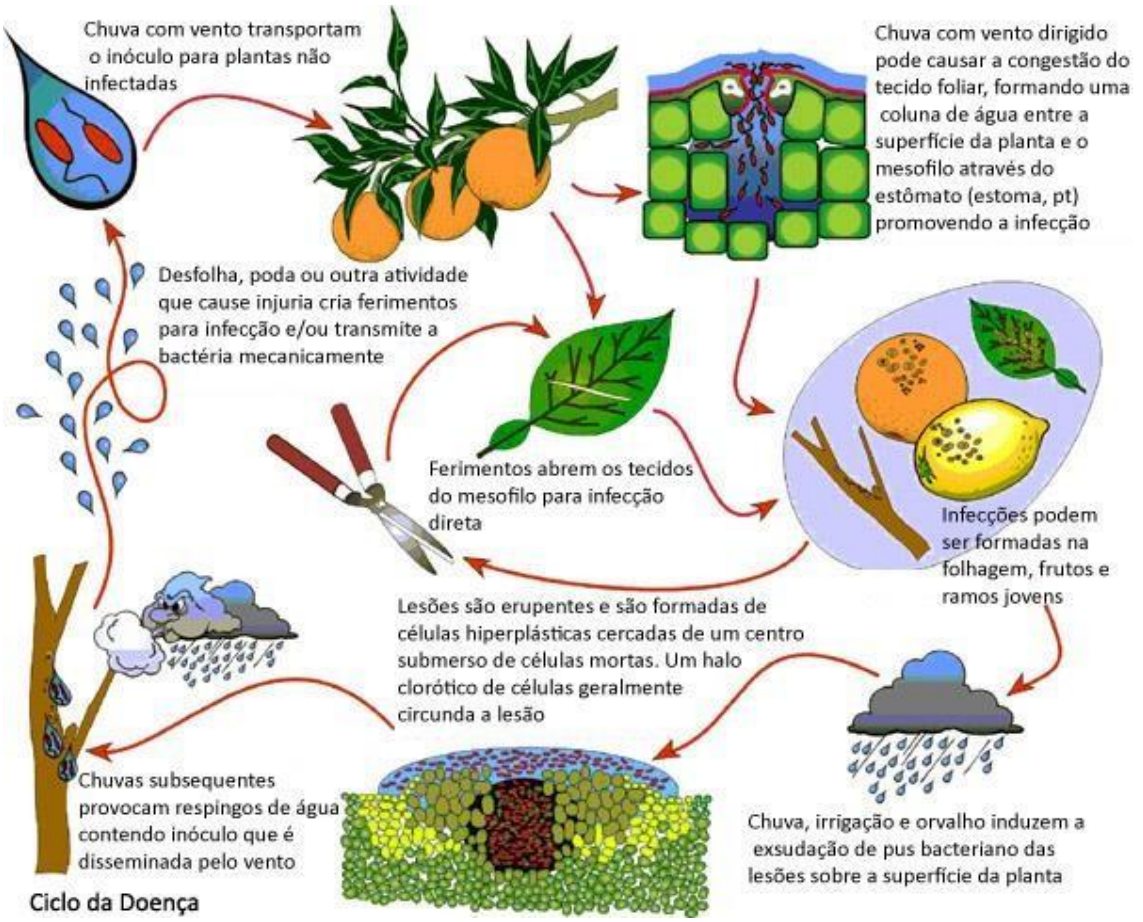

Figura 1 – Ciclo do cancro cítrico (American Phytopathological Society (APS), baseado em GOTTWALD et al., 2002.)

2.4. *Xanthomonas* causadoras do cancro e cancrose cítrica

As *Xanthomonas* são procariotos com formato de bastonetes, uniflagelados, gram-negativos e aeróbicos obrigatórios, e em cultura artificial formam colônias amarelas devido à presença de um pigmento denominado xantomonadina, sendo que alguns isolados são capazes de produzir pigmento escuro quando cultivados em meio de cultura artificial, e mucoides devido à produção de exopolissacarídeos, principalmente a goma xantana, as quais facilitam a dispersão e sobrevivência (DESTÉFANO & RODRIGUES NETO, 2001; SCHAAD et al., 2006).

O cancro e cancrose cítrica é causado por fitopatógenos pertencentes ao gênero Xanthomonas, e pode ser diferenciado em grupos, classificados de acordo com a sintomatologia e patogenicidade que apresentam em diferentes

hospedeiros (ROSSETTI et al., 1993). Na literatura são descritos três tipos de cancrose: A, B e C.

A variante asiática da cancrose (Tipo A) é a forma mais comum, severa, e disseminada da doença, é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xac), considerada a mais virulenta por infectar a grande maioria das espécies de citros. A cancrose “B” é causada pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo B (XauB), um sério problema para a produção de limões na Argentina, Paraguai e Uruguai. A cancrose B causa lesões típicas de cancro em frutos e folhas, porém estas lesões são menores do que as produzidas pela Cancrose tipo A. Em cultura, a bactéria da cancrose B cresce mais lentamente do que as bactérias do cancro A (DAS, 2003). Já a cancrose tipo “C” (Figura 2), causada pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C (XauC), restringe sua patogênese a plantas de– lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia)* e citrumelo “Swingle”(*C. paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata)*,sendo outras espécies cítricas resistentes (JACIANI et al., 2009; JALAN et al., 2014).

Os sintomas gerados nas plantas pela Xac e pela XauC são semelhantes, porém existem métodos para diferenciá-los, entre eles estão: O isolamento da bactéria nas lesões na planta e cultivo em meio sólido pode acarretar em colônias de coloração escura em alguns isolados de XauC (GOTTWALD et al., 2002; JACIANI., 2012; BEHLAU & BELASQUE, 2014). Estratégias moleculares: utilização de DNA e oligonucleotídeos (“primers”) espécie-específicos em reação de PCR visando a identificação e diferenciação entre Xac, XauB e XauC (FONSECA et al., 2019). Testes de patogenicidade em espécies susceptíveis e resistentes infiltrando uma suspensão bacteriana, realizando observação dos sintomas nos dias subsequentes após infiltração na porção inoculada da folha (BEHLAU & BELASQUE, 2014).

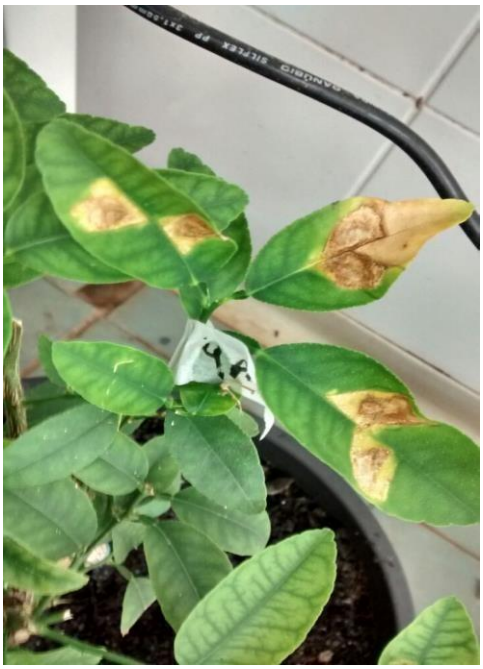

Figura 2 – Sintomas causados pela infecção de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C em folhas de *Citrus aurantifolia*.

2.5. Genética de *Xanthomonas citri pv. aurantifolii* patótipo C

A bactéria XauC quando inoculada em espécies de citros não hospedeiras, induz reação de hipersensibilidade (MALAVOLTA Jr et al., 1984). Esta forma de cancro (cancrose) exibe sintomas semelhantes ao cancro tipo “A”, como descrito no tópico “*O desenvolvimento das doenças de citros causadas por Xanthomonas”*.

Em 2002 foi realizado o primeiro sequenciamento completo do genoma de *Xanthomonas citri* pv. *citri* isolado 306 (Xac 306) (da SILVA et al., 2002), e posteriormente outros diversos isolados de Xac foram sequenciados (JALAN et al., 2013). Em 2010, Moreira e colaboradores disponibilizaram o genoma parcial do isolado 10535 de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*, patotipo C e, recentemente, Fonseca et al. (2019) sequenciaram cinco novos genomas de XauC sendo dois completos – isolados 535, 763, 867, 1559 e 1609.

Análises filogenéticas desses genomas, em conjunto com outros 24 genomas de *Xanthomonas* disponíveis no NCBI, revelaram dois clados principais e distintos: um clado no qual se incluem XauB e XauC e um clado onde se inclui Xac. Foram revelados 4463 genes (NCBI, 2020) no sequenciamento de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C ICPB 10535 e, destes, pouco

sabemos sobre os genes que estão relacionados ao processo infeccioso no hospedeiro e, ainda, 432 genes hipotéticos a serem investigados, dentre os quais podem estar genes-chave deste processo.

2.6. Interação planta-patógeno

As plantas não apresentam um sistema imunológico especializado, capaz de reconhecer rapidamente um invasor e gerar moléculas específicas a cada molécula estranha, como ocorre em animais. Entretanto possuem mecanismos pré-formados para prevenir o ingresso de patógenos, como cutículas cerosas e compostos tóxicos. Além disso, a maioria dos patógenos são altamente especializados e só causam doença em uma variedade de hospedeiros especificos. No entanto, muitos patógenos são capazes de contornar as defesas pré-formadas, e as plantas podem prevenir doenças por reconhecimento desses invasores e interromper seu crescimento (HOLT III et al., 2000).

As interações entre uma planta e seus patógenos envolvem uma comunicação de duas vias. A planta deve ser capaz de reconhecer e se defender contra um patógeno potencial em sua superfície, mas o patógeno também deve ser capaz manipular a biologia da planta para criar um ambiente adequado para o seu crescimento e reprodução. Ambos, as plantas e o patógeno, desenvolveram um conjunto de genes que permitem esta comunicação. Atualmente, as respostas de defesa ativa da planta são consideradas operantes em dois níveis. A primeira linha de defesa ativa da planta envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos PAMPs, que acionam respostas de defesa de plantas. PAMPs são moléculas patogênicas essenciais que são altamente conservadas entre uma gama diversificada de espécies microbianas, são reconhecidas por proteínas receptoras de reconhecimento padrão PPR (*Pattern Recognition Receptors*) da planta. As PAMPs podem ser componentes essenciais dos patógenos, como a proteína quitina dos fungos ou a proteína flagelina de bactéria, ou também podem ser toxinas do patógeno usadas para atacar a planta. O patógeno é capaz de suprimir os diferentes componentes da imunidade acionada por PAMPs através de proteínas "efetoras" entregues na planta (BOYD et al., 2013; LAHAY& BONAS, 2001; KIM et al., 2011).

A segunda linha de defesa da planta envolve o reconhecimento destas proteínas por efetores específicos através de genes de resistência dentro da planta, desencadeando o que muitas vezes é percebido como uma forte resposta de resistência. Este reconhecimento do gene foi denominado "resistência de gene para gene". Nesse tipo de interação, denominada de incompatível ou ‘não hospedeira’, não há indução de sintomas da doença, uma vez que o hospedeiro tem seus mecanismos de defesa ativados e o patógeno não consegue infectar e desenvolver-se em seu interior (HAMMOND-KOSAK; JONES, 2000, DAURELIO et al., 2013). Essa interação, conhecida como uma resposta de hipersensibilidade (HR), desencadeia sintomas visíveis nas folhas da planta como morte celular localizada, lesões necróticas para limitar e conter o patógeno no local de infecção (MUR et al., 2008).

A resposta de hipersensibilidade é o que ocorre entre XauC e quase toda as espécies de citros comerciais, ocasionando o aparecimento de uma região de necrose no local de infecção, evitando o desenvolvimento da doença. No entanto, se a planta é incapaz de reconhecer o patógeno ou não consegue ativar rapidamente as vias de defesa, como é o caso das plantas suscetíveis, a doença ocorre e esta interação é conhecida como interação compatível (GREWAL et al., 2012). Este é o tipo de interação que ocorre entre XauC e as espécies de lima ácida ‘Galego’ e citrumelo ‘*Swingle*’, levando ao desenvolvimento da cancrose.

A limitação da gama de hospedeiros de XauC pode ser relacionada a um gene homólogo ao *AvrGf1* (gene que atua sobre a HR)*, o AvrGf2*, pertencente a família de efetores XopAG. O efetor XopAG possui o motivo conservado CLNAxYD no domínio C-terminal. Mutações nesse domínio presentes no gene *AvrGf2* culminaram na ausência da resposta de hipersensibilidade em toranjas, relacionando este motivo como de extrema importância para a indução da HR (GOCHEZ et al., 2015). Um modelo sugere que a enzima ciclofilina de toranjas, uma espécie cítrica, é capaz de promover mudanças conformacionais no gene *AvrGf2*, ou seja, atuando no enovelamento da proteína através da atividade da peptidil-propil isomerase, a qual catalisa a isomeração cis-trans das ligações peptídicas da prolina (GOCHEZ et al., 2016). As Xanthomonas possuem diversos sistemas de secreção, e o *AvrGf2* adentra a célula vegetal utilizando o sistema de secreção tipo III, como uma forma inativa e logo é reconhecido por um sítio de ligação *Cyp* (GPLL), desencadeando uma resposta de resistência

mais rápida em citros em comparação à HR desencadeada pelo gene *AvrGf1* (GOCHEZ et al., 2015; GOCHEZ et al., 2016).

O gene XopS foi indicado como o responsável por suprimir a expressão do gene de defesa vegetal desencadeado pelas PAMPS, e ele é exclusivo do clado *Citri – Citri* (SCHULZE et al., 2012; FONSECA et al., 2019). O gene *XopF1* é responsável por reprimir a resposta imune desencadeada pelas PAMPs, no arroz,e este gene encontra-se presente no clado *aurantifolii* (MONDAL et al., 2015; FONSECA et al., 2019).

O Sistema de Secreção Tipo 4 (SST4) possui uma série de funções, as quais são fundamentais na patogênese e na adaptação bacteriana. Em Xac306 este sistema está associado às interações célula-célula e, o SST4 cromossômico demonstrou ter envolvimento na morte bacteriana (JACOB et al., 2014; SOUZA et al., 2015). Os genes do SST4 estão arranjados em forma de “cluster” presentes em duas cópias, uma plasmidial e uma cromossômica, no genoma de Xac306 (Da SILVA et al., 2002). Entretanto, em XauB e XauC existe somente um *cluster* presente, provavelmente no plasmídeo, o que pode estar relacionado com a baixa capacidade de competição dessas linhagens com Xac (FONSECA et al., 2019).

Dentre as diversas ferramentas de colonização e defesa que as *Xanthomonas* causadoras de doenças cítricas apresentam, uma delas é a produção de biofilme (RIGANO et al., 2007; MALAMUD et al., 2011).

O pilus tipo IV é de extrema importância no processo da adesão bacteriana à superfície tecidual do hospedeiro, participando ativamente na formação do biofilme, além de ser responsável pela motilidade da bactéria “Twitching” (MATTICK, 2002; DUNGER et al., 2014). Desta forma, a redução da produção de biofilme e a capacidade de agregação de algumas cepas de XauC quando comparadas à Xac306 podem ser explicadas pela ausência dos genes *pilX, pilV, pilA, pill* e *fimT* no genoma de XauC, sendo todos envolvidos com a estrutura do pilus tipo IV (FONSECA et al., 2019).

A XauC também possui ausência do gene homólogo *XAC2670*, possivelmente responsável pela biossíntese de alginato (EPS com relação à formação de biofilme por bactérias do gênero *Pseudomonas*), capaz de prejudicar a composição e regulação do pilus tipo IV (ORGAD et al., 2011; FONSECA et al., 2019). Ainda, a deficiência de adesão tecidual, na síntese de

biofilme e redução da agregação celular, também em XauC, podem estar relacionadas à falta dos genes *XAC1810-XAC1819* presentes em Xac, os quais podem estar relacionados a capacidade de colonizar tecidos das plantas hospedeiras (FONSECA et al., 2019).

Visto a importância da função de diversos genes envolvidos em sistemas de secreção, formação de biofilme, motilidade e demais aspectos, torna-se clara a necessidade de identificar genes relacionados à patogenicidade e virulência, a identificação de genes relacionados à patogenicidade e virulência de XauC pode levar a um melhor entendimento do patossistema XauC-citros, podendo levar ao desenvolvimento de estratégias de combate à doença, seja pela obtenção de uma droga que bloqueie um dos passos do processo por interagir e inibir uma das proteínas codificada por um destes genes alvos, seja pela produção de plantas transgênicas resistentes à bactéria ou ainda, seja pela edição genética do patógeno visando inibir sua patogenicidade. Neste contexto, a utilização de diferentes ferramentas para a identificação de novos genes relacionados à patogenicidade e virulência de XauC, como a análise de biblioteca de mutantes, é de grande importância neste processo (MELLO, 2016).

2.7. Biblioteca de mutantes.

A construção de bibliotecas de mutantes é um método eficiente para o estudo e determinação de genes com função desconhecida. O processo envolve a mutação aleatória de um ou mais genes presentes no genoma bacteriano, utilizando transposons, elementos genéticos que alteram sua posição no DNA. Os transposons estão naturalmente presentes no genoma, mas para fins de pesquisa são construídos artificialmente utilizando uma fração do DNA definida por curtas sequencias invertidas e especificas que codificam a transposase, enzima responsável por catalisar a transposição. Os transposons artificiais também podem carregar genes de resistência para determinados antibióticos, a fim de facilitar a seleção de mutantes gerados (HAYES, 2003).

Esses mutantes são cultivados em meio seletivo contendo o antibiótico específico a que tem resistência. No caso de pesquisas relacionadas à patogenicidade, os mutantes são testados para averiguar quais mostraram diferença na sintomatologia, tanto em redução como possível ausência, em

relação à bactéria não mutada (selvagem), e assim, se tornam mutantes de interesse, em um processo denominado *screening*.

O uso desta tecnologia já foi utilizada em alguns estudos em *Xanthomonas* causadoras de cancro cítrico. Laia et al. (2007) construíram uma biblioteca com ~10.000 mutantes do isolado Xac306, dos quais 3.300 foram submetidos ao "screening" via inoculação em folhas de citros hospedeiro e 44 apresentaram alterações nos sintomas da doença. O sequenciamento da região mutada revelou 35 ORFs diferentes que sofreram interferências do transposon, entre elas oito revelando os genes *hrpB4* e *hrpX*, dois genes pertencentes ao SST3, duas ORFs hipotéticas e o gene *htrA*, que até então não havia sido descrito como relacionado à virulência em fitobactérias.

Oliveira et al. (2018) realizou seu estudo com o mutante "18D5" (proveniente da biblioteca de Laia), o qual possuía a ORF *xac_rs22275* truncada e, quando inoculado em citros susceptível, percebeu-se a redução dos sintomas de necrose. Dentre os mutantes com genes interrompidos pelo transposon caracterizados como hipotéticos na biblioteca construída por Laia (2007), o gene *xac3981* foi motivo de estudo por Silva, em 2019, uma vez que o mutante apresentou atenuação dos sintomas do cancro cítrico em folhas de *C. sinensis* e *C. limonia* Osbeck (popularmente conhecidos como laranja doce e limão-cravo, respectivamente).

Em 2016, foi construída, por Mello, uma biblioteca de mutantes de XauC contendo 672 mutantes, a qual foi desenvolvida utilizando o isolado de XauC, que teve o seu genoma sequenciado - XauC ICPB 10535 (MOREIRA et al., 2010), e se encontra estocada em nosso laboratório.

Pasquini (2020), também utilizou a estratégia de *screening* em seus estudos, utilizando a biblioteca gerada por Mello (2016) encontrando 3 mutantes de potencial interesse. O mutante Δ*XAUC_30580* apresentou redução no sintoma de encharcamento enquanto os outros dois mutantes, Δ*XAUC_12280 (ΔPilY1)* e Δ*XAUC_36880*, demonstraram redução dos sintomas da cancrose, como, necrose e encharcamento, quando comparados a XauC selvagem. O mutante Δ*XAUC_12280 (ΔPilY1)* se relaciona à proteína adesina do *pili* tipo IV, o mutante Δ*XAUC_30580* revelou tratar-se do gene *XAUC_30580*, o qual codifica a proteína Fumarilacetoacetato hidrolase- FAH. A ênfase do presente trabalho é a continuação da análise desses mutantes por inoculação em folhas

de espécie susceptível, visando conhecer mais regiões que possam estar relacionadas à processos patogênicos e/ou virulentos em XauC.

3. OBJETIVO

Realizar o processo de *screening* na biblioteca de mutantes de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C geradas por Mello em 2016, afim de identificar mutantes que apresentem diferença fenotípica, e posteriormente Identificar genes potencialmente envolvidos nos processos de patogenicidade e/ou virulência em espécie cítrica susceptível.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolado bacteriano, meio de cultura e condições de cultivo

A biblioteca de mutantes foi construída utilizando o isolado de XauC que teve o seu genoma sequenciado - XauC ICPB 10535 (MOREIRA et al., 2010), e que se encontra no Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica (LBM) da Universidade Estadual Paulista (Unesp/Jaboticabal-SP). Os estoques bacterianos se encontram armazenados tanto em água de torneira estéril em tubos do tipo criopreservação, à temperatura ambiente, como descritos por Liao, C.-H. e L. M. Shollenberger (2003), como em meio de cultura NBY (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 2 g de extrato de levedura, 2 g de K_2HPO_4, 0,5 g de KH_2PO_4, e água destilada q.s.p. 1000 mL) acrescido de glicerol 8%, mantidos a -80 ºC.

A geração dos mutantes foi feita por mutação aleatória no genoma de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C por transposon (EZ-Tn5 System), o qual possui um gene que confere resistência ao antibiótico canamicina. As células bacterianas de XauC selvagem e mutantes foram multiplicadas em meio de cultura sólido Ágar Nutriente NA (5g de triptona, 3g de extrato de carne, 15g de ágar e 1000 ml de água destilada) a 28°C, por até 8 dias no máximo, uma vez que certos mutantes apresentam um crescimento em placa mais rápido, e outros mais demorado.

Aos meios de cultura sólido e líquido semeados com as células mutantes foi adicionado o antibiótico canamicina, nas concentrações de 50µg/ml, em

ambos, visando a manutenção da pressão de seleção, conforme descrito por Sambrook et al. (1989) e sugerido pelo fabricante do conjunto de reagentes utilizados na geração dos mutantes (Epicentre).

4.2. Teste de patogenicidade *in planta*

Foi realizado o teste de patogenicidade *in planta* com 216 mutantes, oriundos da biblioteca de mutantes gerada por Mello (2016). Após a preparação do inoculo de mutantes e selvagem a uma densidade óptica de 0,3 no aparelho espectrofotômetro (equivalente a 10^8), os mutantes foram inoculados na parte abaxial de folhas jovens de lima ácida 'Galego'. As plantas foram mantidas em laboratório de segurança do Laboratório de Biologia Molecular (UNESP/FCAV, Jaboticabal, SP), sob condições controladas de temperatura (28°C), luminosidade (período 12h claro, 12h escuro) e umidade (70%). A inoculação foi feita utilizando-se seringas estéreis sem agulha, pressionando o êmbolo na parte abaxial das folhas, de forma que o líquido pudesse entrar pelos estômatos (Figura 3). De um lado da nervura foi inoculado a bactéria selvagem e do outro lado da nervura o mutante, a fim de que pudéssemos comparar as respostas na mesma folha. Foi inoculada, também, água utilizada como controle de possíveis contaminações, e se o êmbolo da seringa estaria causando alguma injúria à folha. Durante um período de 25 dias os mutantes foram observados, em comparação com a bactéria selvagem inoculada na mesma concentração e nas mesmas folhas.

Os mutantes que apresentaram alguma variação em comparação com o selvagem ativeram 3 réplicas técnicas, e 3 réplicas biológicas realizadas.

Figura 3 - Método de inoculação por infiltração na região abaxial da folha.

4.3. PCR inversa e sequenciamento

A estratégia utilizada para a identificação do gene mutado em cada XauC mutante, que apresentou fenótipo diferente da bactéria selvagem, foi a PCR inversa (OCHMAN et al, 1988) que consistiu em: digestão do DNA total com a enzima de restrição *EcoR*I; ligação dos fragmentos digeridos com a enzima T4 ligase; amplificação dos fragmentos utilizando os iniciadores (*primers*) específicos para o transposon; purificação das bandas amplificadas; quantificação e sequenciamento utilizando os *primers* específicos para o transposon e que direcionam a síntese de DNA para fora das duas extremidades do transposon, ou seja, em direção ao gene no qual ocorreu a inserção.

A PCR inversa teve duas abordagens: a primeira com os passos de purificação utilizando-se o kit *Wizard Gel and PCR clean up* (PROMEGA), e a segunda com os passos de purificação sendo realizados pelo processo de Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK et al., l989) para selecionar a purificação com maior qualidade em concentração e pureza. Cada uma destas etapas estão detalhadas a seguir.

4.3.1. Extração de DNA total de XauC mutado

O clone mutado de XauC que apresentou a sintomatologia alterada foi multiplicado em tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 6 mL do meio de cultura NA líquido adicionado de 50 µg/mL de canamicina, por 72 horas a 28ºC, sob agitação contínua a 200 rpm (Inova Incubator Shaker 4430). A extração do DNA total foi realizada com o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante e purificada utilizando *o Kit Wizard Gel and PCR clean up* (PROMEGA) seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a amostra de DNA teve suas concentrações mensuradas no equipamento NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). O DNA extraído foi visualizado em gel de agarose 1%, a 0,4V/cm, e o tamanho da banda resultante foi comparado com o marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas).

4.3.2. Digestão do DNA total dos mutantes

A digestão do DNA total do mutante foi realizada utilizando a enzima de restrição *Eco*RI. A digestão foi realizada com *Eco*RI (10U/ µl) (Fermentas) e 5 µg de DNA total, a 37ºC durante 16 horas (Tabela 1). A inativação foi realizada a 80ºC durante 5 minutos. Para a verificação do sucesso desta etapa, o produto da digestão, juntamente com 200µg de DNA não digerido e 200 µg de DNA digerido foram visualizados em gel de agarose 1%, a 0,4V/cm, e os tamanhos das bandas resultantes foram comparados com o marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas). O DNA digerido foi purificado utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a amostra de DNA teve suas concentrações mensuradas no equipamento NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc).

Tabela 1 – Digestão do DNA total do mutante

Reagentes	**Quantidade/ Concentração final**
DNA total do mutante	5 µg
10X Buffer Tango (Fermentas)	0,5 X
*Eco*RI (10U/µl) (Fermentas)	10U
Água estéril q.s.p.	q.s.p. 100 µl

4.3.3. Ligação do DNA digerido dos mutantes

Visando a circularização do fragmento de DNA para posterior amplificação utilizando os *primers* do transposon Tn5, os fragmentos de DNA digeridos foram ligados utilizando a enzima T4 ligase (Tabela 2), utilizando os seguintes reagentes e concentrações:

Tabela 2 – Ligação do DNA digerido do mutante com T4 DNA Ligase.

Reagentes	**Quantidade/ Concentração final**
DNA digerido do mutante	1 µg
10X *ligation buffer* (Biolabs)	10X
T4 DNA Ligase (400U/µl)(Biolabs)	400U
Água estéril	q.s.p. 100 µl

A ligação foi realizada a 16ºC, durante 16 horas, e a inativação a 65ºC, durante 10 minutos. O DNA ligado foi purificado utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a amostra de DNA teve suas concentrações mensuradas no equipamento NanoDrop ND-1000.

4.3.4. Amplificação dos fragmentos de DNA circularizados utilizando os oligonucleotídeos específicos para o transposon

Com a finalidade de se realizar seleção e amplificação dos fragmentos de DNA de cada mutante onde ocorreu o evento de transposição, foi realizada uma PCR com os *primers:* Primer Kan 2F 5'- ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC

-3', *Primer* Kan 2R GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG, os quais possuem sítios de ancoramento dentro do transposon Tn5 (Tabela 3), utilizando as seguintes condições PCR para o mutante:

Tabela 3 - Amplificação dos fragmentos de DNA circularizados do mutante com os oligonucleotídeos específicos para o transposon.

Reagentes	**Quantidade/ Concentração final**
DNA ligado	600ng
5X Colorless GoTaq reaction Buffer (PROMEGA)	1X
dNTPs (2,5mM Invitrogen)	10mM
Primer Kan 2F (10mM)(Sigma)	2,5
Primer Kan 2R (10mM)(Sigma)	2,5
GoTaq DNA Polimerase (5U/µl PROMEGA)	5U
Água estéril	q.s.p.50 µl

A desnaturação inicial foi realizada a 98ºC durante 30 segundos, em seguida de 35 ciclos de amplificação a 98 ºC durante 10 segundos, 68ºC durante 30 segundos e 72 ºC durante 45 segundos, e extensão final a 72 ºC durante 10 min. Com o DNA molde circularizado, almejou-se a amplificação de duas regiões do gene mutado. O produto da PCR inversa foi purificado utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a amostra de DNA teve suas concentrações mensuradas no equipamento NanoDrop ND-1000.

4.3.5. Purificação por Fenol-Clorofórmio

Foi realizado o processo de purificação por Fenol-Clorofórmio, nas mesmas etapas em que se utilizou o *Kit Wizard Gel and PCR clean* up (PROMEGA). Esse processo consistiu em aferir o volume da solução, ajustar para um volume máximo de 500 µl com T.E. (10:1), adicionar 1 volume de Fenol pH 8, e vortexar por 30 segundos e centrifugar, a 25 ºC, a 20.800g por 5 minutos. Após a

centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e transferido para o tubo 2. Aferido o volume total no tubo 2, foram adicionados 0,5 volume de Fenol e 0,5 volume de clorofórmio, vortexada por 30 segundos e centrifugada a 25 ºC e 20.800g por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi recuperado e transferido para um tubo 3. Auferido o volume total no tubo 3, foi adicionado 1 volume de clorofórmio, vortexada a amostra por 30 segundos e em seguida centrifugada a 25 ºC e 20.800g por 5 minutos. Este sobrenadante foi recuperado e passado para o tubo 4. Aferido o volume do tubo 4 foi adicionado 1/10 do volume de Acetato de sódio (3M, pH 5,2) e agitado por 30 segundos manualmente. Foi adicionado 2,5 de volume de etanol absoluto e deixado 15 horas a -20 ºC. Em sequência foi realizada uma centrifugação a 4ºC e 20.800g por 30 minutos. Descartado o sobrenadante, foi adicionado 1mL de etanol 70% gelado e invertido 10 vezes. Centrifugado a 25 ºC e 20.800g por 5 minutos, o sobrenadante então foi descartado e o tubo seco em bomba a vácuo por 5 minutos. Posteriormente o DNA foi ressuspendido em T.E. 10: 0,1.

4.3.6 Sequenciamento

As amostras foram enviadas para o *CREBIO* - Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica Câmpus de Jaboticabal – Unesp, Sequenciador Automático de Primeira Geração (Método de Sanger) com 96 capilares, ABI 3730 xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, CA).

5. RESULTADOS

5.1. Crescimento bacteriano *in vitro* e sintomas

Foram analisados, quanto ao crescimento *in vitro* (placa com meio de cultivo) e *in planta*, 216 mutantes de XauC. Houve uma grande diferenciação no crescimento bacteriano em placa contendo meio de cultivo NA com canamicina, tendo 57 mutantes que não apresentaram crescimento e, entre os que cresceram colônias, demonstraram diferença no tempo de crescimento.

O tempo médio de crescimento das colônias variou entre quatro e cinco dias (131 mutantes). Alguns mutantes apresentaram desvios neste tempo de crescimento para até 8 dias (26 mutantes), e alguns apresentaram colônias já no

segundo dia (*ΔXauC_P4C11* e *ΔXauC_P4B12)*, a repetição do processo de crescimento em meio só ocorreu nos mutantes que não apresentaram crescimento no primeiro plaqueamento.

Em relação aos sintomas, 152 mutantes começaram a apresentar, 5 dias após a inoculação, sintomas clássicos aos de cancrose cítrica tipo C (encharcamento e morte celular localizada), comparadas ao controle selvagem *XauC_w* o qual começou a apresentar sintomas no mesmo período.

Ainda, 7 mutantes, os quais *ΔXauC_P4F1, ΔXauC_P4C4, ΔXauC_P4G7, ΔXauC_P4H9, ΔXauC_P5F11, ΔXauC_P5B7 e ΔXauC_P5H12* apresentaram sintomas de cancrose alterados como ausência ou menor intensidade, na primeira inoculação *in planta,* porém, em uma repetição de inoculação, os mesmos voltaram a apresentar sintomas clássicos de cancrose.

Um dos mutantes, o *ΔXauC_P4G7* apresentou alteração nos sintomas clássicos de cancrose tipo C, comparando com o controle, e apresentou reprodutibilidade nos testes.

5.2. Teste de Patogenicidade *in planta*

De todos os mutantes analisados *in planta*, um mutante se mostrou de interesse, pois apresentou exclusão dos sintomas clássicos de cancrose tipo C em todas repetições (3 dias de inoculações diferentes em 3 plantas diferentes) (Figura 4), nomeado de *ΔXauC_P4G7.* Assim, este mutante mutou uma região genômica que provavelmente possui relação direta ou indireta com um gene (ou genes) relacionado a processos de patogenicidade ou virulência de XauC.

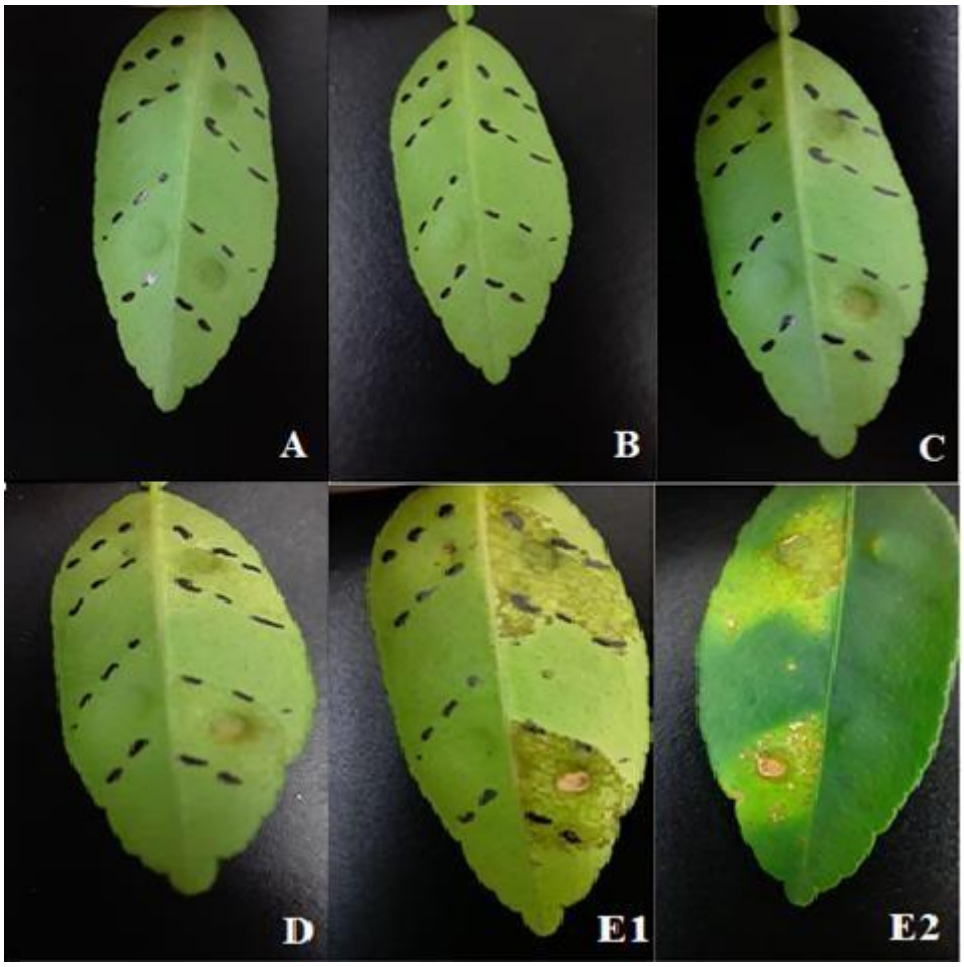

Figura 4 – Redução do sintoma de cancrose tipo C apresentados pelo mutante (lado esquerdo) *ΔXauC_P4G7* em relação ao controle selvagem (lado direito) aos 25 dias após a inoculação (DAI).

O mutante *ΔXauC_P4G7* também foi analisado juntamente com uma inoculação da bactéria selvagem e água (Figura 5) a fim de comparar os sintomas do mutante com o da inoculação de água, assim como danos causados pela seringa. Ademais, foi comparado com um outro mutante (*ΔXauC_P5B4*) que não havia apresentado diferenciação do selvagem anteriormente (Figura 6) para garantir que apenas o processo de mutação em si não acarretaria diferença no fenótipo.

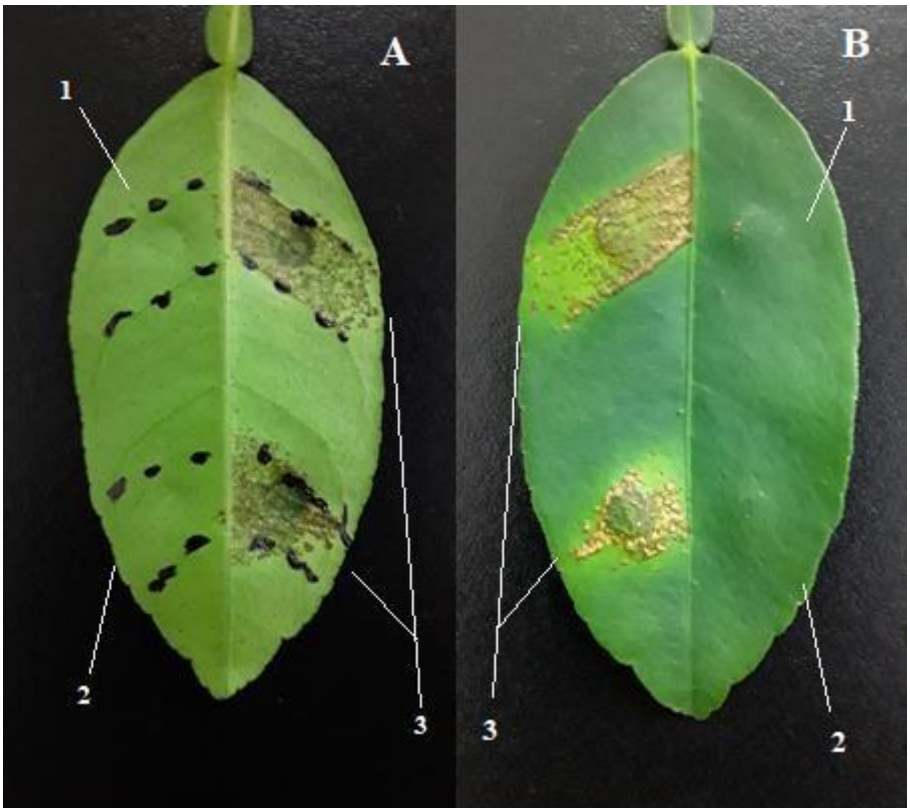

Figura 5 – Sintoma de cancrose tipo C apresentados pelo mutante *ΔXauC_P4G7* (1), Água (2) e XauC selvagem (3), 25 dias após a inoculação. A: região abaxial e B: região adaxial.

Figura 6 – Sintoma de cancrose tipo C apresentado pelo mutante *ΔXauC_P4G7 (1)* e pelo mutante *ΔXauC_P5B4 (2).*

5.3. PCR inversa

Após o processo de purificação, a amostra de DNA extraído do mutante *ΔXAUC*_P4G7 apresentou um valor de concentração de 202,8ng/µl, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Relação de absorbância 260/280 – 260/230, e concentração do mutante *ΔXAUC*_P4G7 após a extração.

Mutante	Relação da Absorbância 260/280nm	Relação da Absorbância 260/230nm	Concentração (ng/µl)
***ΔXAUC*_P4G7**	1,90	0,84	202,8

A amostra de DNA digerido, após o processo de purificação teve sua concentração mensurada no equipamento NanoDrop ND-1000, e apresentou um valor de 115,8ng/µl conforme Tabela 5.

Tabela 5 – Relação de absorbância 260/280 – 260/230, e concentração do DNA do mutante *ΔXAUC*_P4G7 após a digestão.

Mutante	Relação da Absorbância 260/280nm	Relação da Absorbância 260/230nm	Concentração (ng/µl)
***ΔXAUC*_P4G7**	1,87	1,76	115,8

A amostra de DNA ligado, após o processo de purificação teve sua concentração mensurada no equipamento NanoDrop ND-1000, e apresentou um valor de 68,44ng/µl conforme a Tabela 6.

Tabela 6 – Relação de absorbância 260/280 – 260/230, e concentração do mutante *ΔXAUC*_P4G7 após a ligação.

Mutante	Relação da Absorbância 260/280nm	Relação da Absorbância 260/230nm	Concentração (ng/µl)
***ΔXAUC*_P4G7**	3,22	1,77	68,44

A amostra de DNA resultante da PCR inversa, após o processo de purificação teve sua concentração mensurada no equipamento NanoDrop ND-1000, e apresentou um valor de 48,2ng/µl conforme a Tabela 7.

Tabela 7 – Relação de absorbância 260/280 – 260/230, e concentração do mutante *ΔXAUC*_P4G7 após a PCR inversa.

Mutante	Relação da Absorbância 260/280nm	Relação da Absorbância 260/230nm	Concentração (ng/µl)
***ΔXAUC*_P4G7**	1,78	1,06	48,2

A amostra de DNA resultante da PCR inversa, após o processo de purificação teve sua concentração mensurada no equipamento NanoDrop ND-1000, e apresentou um valor de 48,2 ng/µl conforme a Tabela 7 e Figura 10.

Tabela 7 – Relação de absorbância 260/280 – 260/230, e concentração do mutante *ΔXAUC*_P4G7 após a PCR inversa.

Mutante	Relação da Absorbância 260/280nm	Relação da Absorbância 260/230nm	Concentração (ng/µl)
***ΔXAUC*_P4G7**	1,78	1,06	48,2

5.4. 5.4.

5.4.1. Visualização do DNA em gel de agarose

O DNA extraído e digerido, foi visualizado em gel de agarose 1%, a 0,4V/cm, e o tamanho da banda resultante foi comparado com o marcador de peso molecular de 1Kb (Fermentas) (Figura 11).

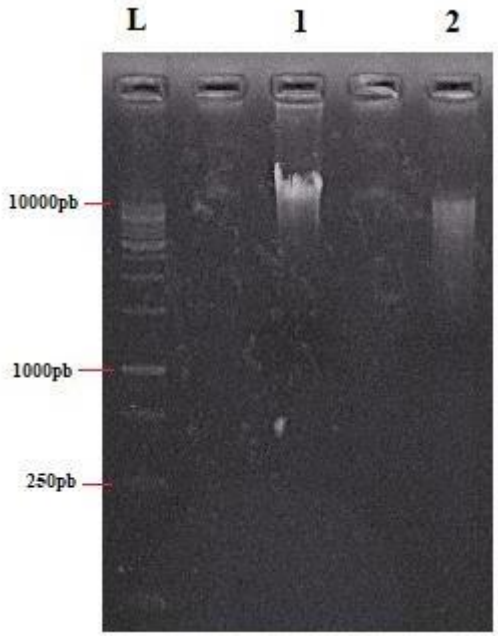

Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose a 1% do DNA do mutante *ΔXAUC*_P4G7: (1) DNA total extraído; (2) DNA total digerido, (L) marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen)

5.4.2. Sequenciamento

As amostras purificadas com o *Kit Wizard Gel and PCR clean up* (PROMEGA) e por fenol-clorofórmio foram enviadas para sequenciamento e não obtiveram uma leitura com picos de base adequados, para uma comparação com os genomas já sequenciados, impossibilitando, com essas amostras, identificar qual gene ou região genômica obteve a inserção do transposon, e consequentemente não sendo possível analisar qual a relação entre a região e os sintomas da cancrose (Figuras 12, 13, 14 e 15).

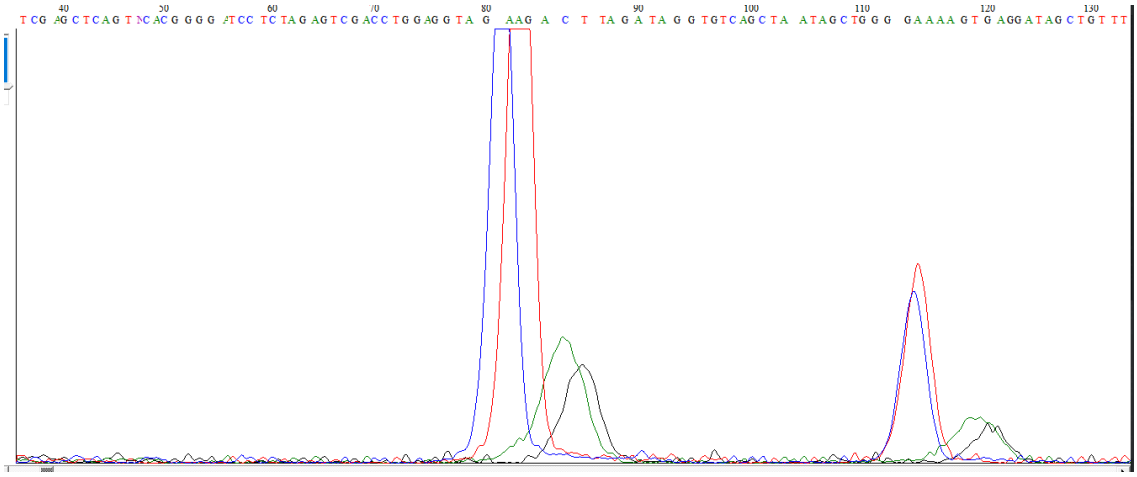

Figura 12 – Sequenciamento da amostra *Reverse* de DNA do mutante *ΔXAUC*_P4G7 purificada pelo método de fenol-clorofórmio.

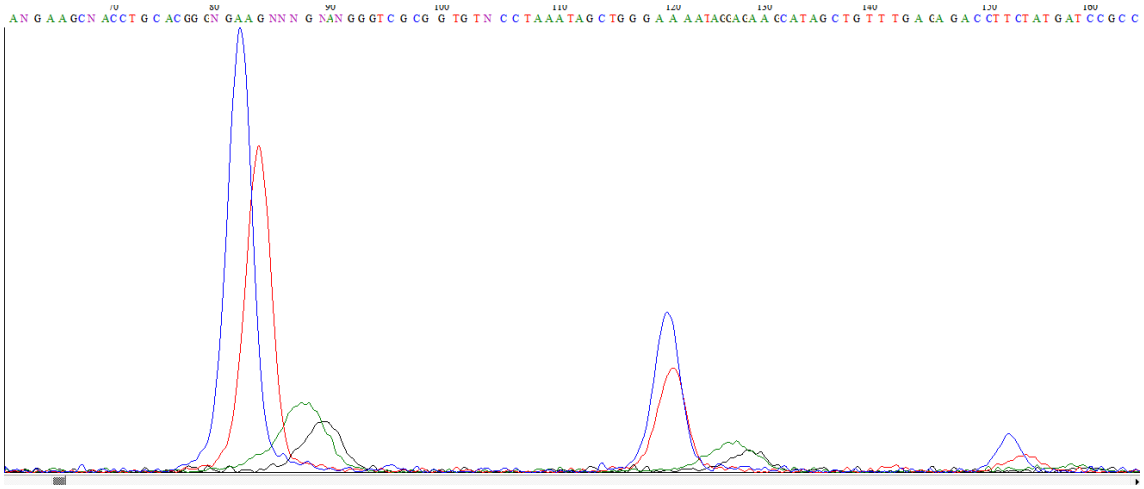

Figura 13 – Sequenciamento da amostra *Forward* de DNA do mutante *ΔXAUC*_P4G7 purificada pelo método de fenol-clorofórmio.

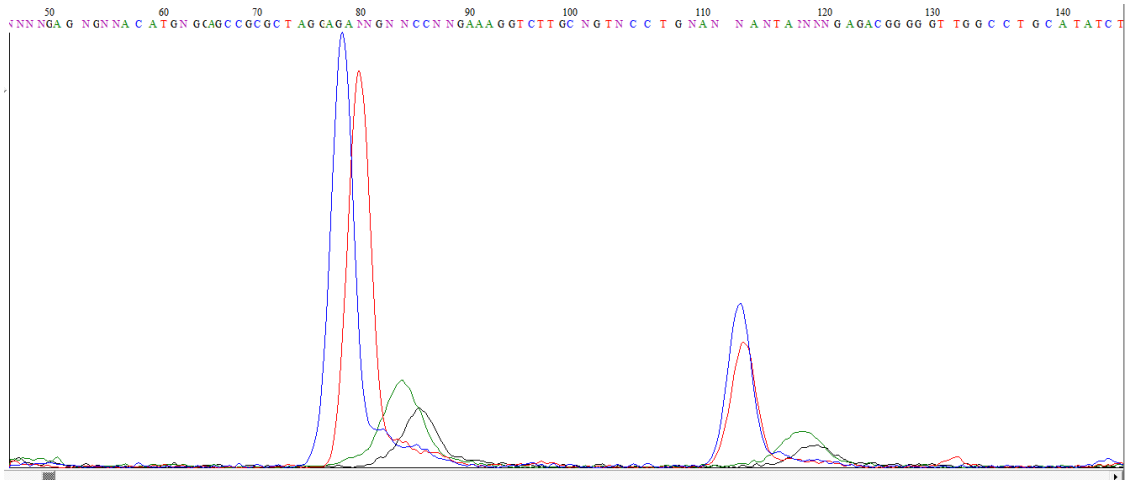

Figura 14 - Sequenciamento da amostra *Reverse* de DNA do mutante *ΔXAUC*_P4G7 purificada pelo Kit Wizard Gel and PCR clean up (PROMEGA).

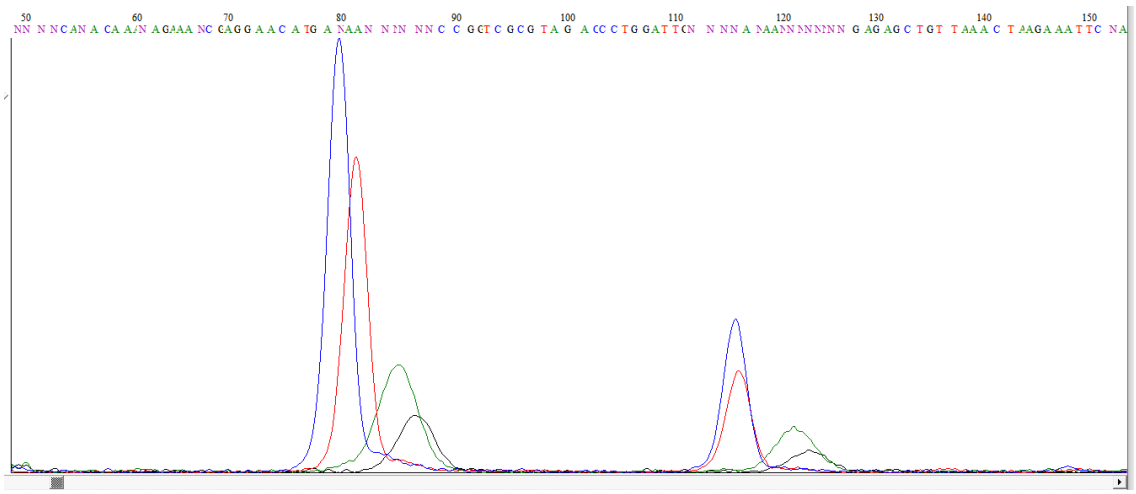

Figura 15 – Sequenciamento da amostra *Forward* de DNA do mutante *ΔXAUC*_P4G7 purificada pelo Kit Wizard Gel and PCR clean up (PROMEGA).
.

6. DISCUSSÃO

6.1. As mutações alteram o crescimento celular em meio de cultura?

O meio de cultura para o crescimento dos mutantes era seletivo e possuía uma quantidade considerável do antibiótico canamicina. Houve um atraso de crescimento em uma parcela substancial dos mutantes estudados, uma vez que a bactéria selvagem também apresentava um crescimento em torno do quarto e quinto dia, como a maioria dos mutantes.

A inserção do transposon (contendo o gene de resistência a Canamicina) em um sítio aleatório do genoma levou os mutantes a adquirirem resistência ao antibiótico os quais, ao crescerem em meio seletivo, pode levar ao retardo no crescimento. Ainda, a inserção do transposon pode afetar sutilmente a expressão de algum gene elementar, também acarretando no retardo do crescimento bacteriano.

57 de 216 mutantes não apresentou crescimento em placa, levando à suposição da perda do transposon, não concedendo, portanto, a resistência ao antibiótico.

6.2. Como os mutantes se comportam ao serem inoculados nas folhas de espécie cítrica susceptível a Xauc?

A maioria dos mutantes, após serem inoculados em folhas de uma variedade de citros susceptível a Xauc, não levaram à alteração nos sintomas clássicos de cancrose tipo C (encharcamento e morte celular localizada), ao serem comparados com o controle selvagem, como esperado, uma vez que a inserção do transposon é aleatória, e apenas partes específicas do genoma estão relacionadas ao processo de patogenicidade/virulência. Isso indica que o transposon não se inseriu em uma região relacionada ao desenvolvimento da doença, como motilidade, produção de goma xantana, capacidade invasiva da célula hospedeira, entre outros.

Os locais de inoculação, nas folhas de citros, do controle selvagem e dos mutantes apresentaram os primeiros sintomas de cancrose a partir do DAI 9 (mesmo fracos), e aumentaram a intensidade a partir do DAI 15.

Mesmo com as tentativas de padronização da idade foliar por exemplo, esse método não é perfeito, pois o ponto para inoculação da folha era medido pelo seu aspecto, e não por um dado exato, como a idade da mesma, o que pode ter afetado o desenvolvimento da cancrose nos mutantes que apresentaram alterações durante a primeira inoculação.

Vários mutantes apresentaram sintomas de cancrose alterados na primeira inoculação *in planta,* porém, em uma repetição de inoculação, os mesmos voltaram a apresentar sintomas clássicos de cancrose.

Várias são as suposições que possam explicar a não-reprodutibilidade desta alteração nos sintomas nos mutantes acima citados, desde possíveis falhas durante o processo de inoculação *in* planta, tais como utilização de folhas senescentes, danificação física da folha durante o processo, entre outros.

Podem ocorrer, também, processos como contaminação com colônias de outros mutantes e processos comuns em tranposons, como: transposon translocar para outra região no genoma e o mutante possuir mais de uma inserção transposômica e perder a inserção no *locus* atuante sobre o fenótipo, entre outros.

6.3. O que podemos dizer sobre o mutante *ΔXAUC*_P4G7?

O mutante *ΔXAUC*_P4G7 foi o único a manter sua diferença sintomatológica ao longo das repetições dos testes, teve seu crescimento em

placa equivalente ao da bactéria selvagem e da maioria dos mutantes (quatro a cinco dias) e, ao longo de 25 dias de análises após inoculação, não demonstrou nenhum sintoma de cancrose.

Os procedimentos para a realização do sequenciamento se mostraram adequados pela análise da qualidade e da quantidade de DNA Porém o resultado das amostras sequenciadas não apresentou qualidade suficiente para a identificação do gene mutado e, sendo assim, não foi possível realizar uma análise *in sílico* com os bancos de dados já existentes.

Embora o teste de patogenicidade *in planta* tenha apresentado uma visível diferença sintomática, ou seja, o desaparecimento dos sintomas de cancrose, ele por si não nos revela qual gene relacionado a processos de patogenicidade de XauC foi nocauteado.

A bactéria inoculada pode não ter apresentado os sintomas devido a outros motivos, como o enfraquecimento da capacidade virulenta pelo tempo de estocagem em temperatura baixa, entre outros. O que se pode afirmar é que a bactéria tem o transposon inserido em seu genoma, uma vez que foi cultivada em meio com antibiótico, e que nos testes *in planta* ela apresentou desaparecimento dos sintomas clássicos de cancrose tipo C. Assim, mesmo ainda sem a identificação, este trabalho revelou uma região genômica de possível importância no processo de patogenicidade de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C, o qual os processos de uma nova PCR inversa e sequenciamento seguem em andamento.

7. CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo permitiram reafirmar que o *screening* de uma biblioteca de mutantes é uma ferramenta importante na busca de genes de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* patótipo C potencialmente envolvidos nos processos de patogenicidade e/ou virulência em espécie cítrica susceptível.

Portanto, este estudo possibilitou a identificação de uma região genômica relacionada a estes processos, contribuindo, para um futuro entendimento da biologia da interação XauC-citrus.

8. REFERÊNCIAS:

AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. A epidemiologia do cancro cítrico. *Summa Phytopathologica*, v. 27, n. 1, p. 151-156, 2001.

American Phytopathological Society (APS), 2005, disponível em https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/prokaryote/pdlessons/Pages/CitrusCankerPort.aspx

BEHLAU, F.; BARELLI, N. L.; BELASQUE JR, J. Lessons from a case of successful eradication of citrus canker in a citrus-producing farm in São Paulo State, Brazil. *Journal of plant pathology*, v. 96, n. 3, p. 561-568, 2014.

BOYD, L.A.; RIDOUT, C.; O'SULLIVAN, D.M.; LEACH, J.E.; LEUNG, H. Plant pathogen interaction: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, v. 29, p. 233-240, 2013.

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

Chiesa, M. A., Siciliano, M. F., Ornella, L., Roeschlin, R. A., Favaro, M. A., Delgado, N. P., ... & Marano, M. R. (2013). Characterization of a variant of Xanthomonas citri subsp. citri that triggers a host-specific defense response. *Phytopathology*, *103*(6), 555-564.

DAS, A. K. Citrus canker - A review. *Journal of Applied Horticulture*, v. 5, n. 1, p. 52-60, 2003.

DAURELIO, L. D. et al. Characterization of *Citrus sinensis* transcription factors closely associated with the non-host response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of plant physiology*, v. 170, n. 10, p. 934-942, 2013.

DESTEFANO, S.A.L; RODRIGUES NETO, J.. Caracterização de *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* (Tipo C) produtora de pigmento escuro. *Summa phytopatológica*, v. 27, n. 3, p. 287-291, 2001.

Dunger, G., Guzzo, C. R., Andrade, M. O., Jones, J. B., & Farah, C. S. (2014). Xanthomonas citri subsp. citri type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*(10), 1132-1147.

FONSECA, N. P. et al. Detection and identification of Xanthomonas pathotypes associated with citrus diseases using comparative genomics and multiplex PCR. *PeerJ,* v. 7, p. e7676, 2019.

FUNDECITRUS – Fundo de defesa da citricultura. Doenças e pragas- Cancro cítrico. Disponível em: http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7, 2020.

FUNDECITRUS. Fundo Da Defesa Da Citricultura –Safra 2019/20 teve a maior taxa de queda de frutos; dentre as pragas e doenças, *greening* foi a principal causa. Disponível em: < https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-201920-teve-a-maior-taxa-de-queda-de-frutos-dentre-as-pragas-e-doencasgreening-foi-principal-causa/939 >, 2021.

GOTTWALD, T. R.; GRAHAM, James H.; SCHUBERT, Tim S. Citrus canker: the pathogen and its impact. *Plant Health Progress*, v. 3, n. 1, p. 15, 2002.

Gochez, A. M., Minsavage, G. V., Potnis, N., Canteros, B. I., Stall, R. E., & Jones, J. B. (2015). A functional Xop AG homologue in Xanthomonas fuscans pv. aurantifolii strain C limits host range. *Plant pathology*, *64*(5), 1207-1214.

Graham, J. H., Gottwald, T. R., Cubero, J., & Achor, D. S. (2004). Xanthomonas axonopodis pv. citri: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular plant pathology*, *5*(1), 1-15.

GREWAL, R. K.; GUPTA, S.; DAS, S. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* triggers immediate transcriptomic modulations in rice. *BMC Genomics,* v. 13, p. 49 -61, 2012.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists. cap.21, p.1102–1156, 2000.

HAYES, F.; Transposon-based strategies for microbial functional genomics and proteomics. *Annual review of genetics*, v. 37, n. 1, p. 3-29, 2003.

HOLTI III, B.F.; MACKEY, D.; DANGL, J.L. Recognition of pathogens by plants. *Current Biology*, v.10, n.1, p. r5-r7. 2000.

Jaciani, F. J., Destéfano, S. A. L., Neto, J. R., & Belasque Jr, J. (2009). Detection of a new bacterium related to Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii infecting swingle citrumelo in Brazil. *Plant Disease*, *93*(10), 1074-1074.

Jaciani, F. J., Ferro, J. A., Ferro, M. I. T., Vernière, C., Pruvost, O., & Belasque Jr, J. (2012). Genetic Diversity of a brazilian strain collection of Xanthomonas citri subsp. citri based on the type III effector protein genes. *Plant disease*, *96*(2), 193-203.

Jacob, T. R., Laia, M. L. D., Moreira, L. M., Gonçalves, J. F., Carvalho, F. M. D. S., Ferro, M. I. T., & Ferro, J. A. (2014). Type IV secretion system is not involved in infection process in citrus. *International journal of microbiology*, *2014*.

JALAN, N.; YAN, Q.; KGENARU, K.; JONESM J.B.; GRAHAM, J.H.; WANG, N. Genomics of *Xanthomonas citri* and Related Species. In: GROSS, D.C.; LICHENSPARK, A.; LOLE, C. *Genomics od Plant-Associated Bacteria*. (Ed.) Springer, p. 151176, 2014.

KIM, K.H.; KANG, Y.L.; KIM, D.H.; YOON, M.Y.; MOON, J.K.; KIM, M.Y.; VAN KAND LEE, S-H. RNA-Seq analysis of soybean near-isogenic line carrying bacterial leaf pustule-resistant and susceptible alleles. *DNA Research*, v. 18, p. 483-497, 2011.

Jalan, N., Kumar, D., Yu, F., Jones, J. B., Graham, J. H., & Wang, N. (2013). Complete genome sequence of Xanthomonas citri subsp. citri strain Aw12879, a restricted-host-range citrus canker-causing bacterium. *Genome Announcements*, *1*(3), e00235-13.

KOLLER, O. L.; SOPRANO, E.; BOANS, U. Normas técnicas para a cultura de citros em Santa Catarina. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina. S.A **-** EPAGRI, v 14. n 1. 66 p,1994.

LAHAYE, T.; BONAS, U. Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends in Plant Science*, v. 6, p. 479-485, 2001.

LAIA, M. L. de. Análise funcional de genes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* implicados na patogênese. 2007.

Malamud, F., Conforte, V. P., Rigano, L. A., Castagnaro, A. P., Marano, M. R., Morais do Amaral, A., & Vojnov, A. A. (2012). Hrp M is involved in glucan biosynthesis, biofilm formation and pathogenicity in X anthomonas citri ssp. citri. *Molecular plant pathology*, *13*(9), 1010-1018.

Malavolta Júnior, V. A., Yamashiro, T., Nogueira, E. M. C., & Feichtenberger, E. (1984). Distribuição do tipo C de Xanthomonas campestris pv. citri no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathologica*, *10*(11).

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. *Annual Reviews in Microbiology*, v. 56, n. 1, p. 289-314, 2002.

MELLO, J.A.F. Identificação e análise *in silico* de genes de *Xanthomonas fuscans* subsp *aurantifolii* tipo C implicados na patogênese. 2016. 66 f. Trabalho de conclusão de curso referente a graduação em Ciências Biológicas.; Faculdade

de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

Moreira, L. M., Almeida, N. F., Potnis, N., Digiampietri, L. A., Adi, S. S., Bortolossi, J. C., ... & Setubal, J. C. (2010). Novel insights into the genomic basis of citrus canker based on the genome sequences of two strains of Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii. *BMC genomics*, *11*(1), 1-25.

Mur, L. A., Kenton, P., Lloyd, A. J., Ougham, H., & Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of experimental Botany*, *59*(3), 501-520.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESONI, F.; KALAI, R.B.O. Retrato da citricultura brasileira, vol 1. Ed. Marcos Fava Neves, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, v. 1. p 1-138. 2010.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G. *Anuário da citricultura* 2017, CITRUSBR, São Paulo, Brasil v. 1. P 1-60. 2017.

Oliveira, A. C., Ferreira, R. M., Ferro, M. I. T., Ferro, J. A., Chandler, M., & Varani, A. M. (2018). Transposons and pathogenicity in Xanthomonas: acquisition of murein lytic transglycosylases by TnXax1 enhances Xanthomonas citri subsp. citri 306 virulence and fitness. *PeerJ*, *6*, e6111.

Orgad, O., Oren, Y., Walker, S. L., & Herzberg, M. (2011). The role of alginate in Pseudomonas aeruginosa EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. *Biofouling*, *27*(7), 787-798..

OCHMAN, Howard; GERBER, Anne S.; HARTL, Daniel L. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, v. 120, n. 3, p. 621-623, 1988.

Oh, Y., Donofrio, N., Pan, H., Coughlan, S., Brown, D. E., Meng, S., ... & Dean, R. A. (2008). Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. *Genome biology*, *9*(5), 1-24.

PASQUINI, I.C. Identificação e análise de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade de Xanthomonas citri pv. aurantifolii tipo C. 2020. Diseertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciencias Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2020.

Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendín, L., Filippone, P., Torres, P. S., ... & Marano, M. R. (2007). Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker

development in Xanthomonas axonopodis pv. citri. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*(10), 1222-1230.

ROSSETTI, V.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Doenças dos citros causada por algas, fungos, bactérias e vírus. [S.l.]: Fundação Cargill, 84 p., 1993.

Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Sechler, A., Agarkova, I. V., Stromberg, P. E., ... & Vidaver, A. M. (2006). Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Papers in Plant Pathology*, 96.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, Tom. Molecular cloning: a laboratory manual/J. Sambrook, EF Fritsch, T. Maniatis. 1989.

Schulze, S., Kay, S., Büttner, D., Egler, M., Eschen-Lippold, L., Hause, G., ... & Bonas, U. (2012). Analysis of new type III effectors from Xanthomonas uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. *New Phytologist*, *195*(4), 894-911.

SECRETARIA DO TRABALHO DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL. 2020, disponível em https://www.agricultura.sp.gov.br/noticias/citricultura-gerou-mais-de-48-mil-novas-vagas-de-emprego-em-2019/

da SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; VAN SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.; DO AMARAL, A.M. et al. Comparison of the genomes of two Xanthonomas pathogens with differing host specificities. *Nature*, v.417, p.459463, 2002.

Souza, D. P., Oka, G. U., Alvarez-Martinez, C. E., Bisson-Filho, A. W., Dunger, G., Hobeika, L., ... & Farah, C. S. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nature communications*, *6*(1), 1-9.