

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE GENES
POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE
DE *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C

Iashilei Cassieli Pasquini

Bióloga

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE GENES
POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE
DE *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C

Iashilei Cassieli Pasquini

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientadora: Dr^a. Helen Alves Penha

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

2020

P284i Pasquini, Iashilei Cassieli
Identificação e análise de genes potencialmente envolvidos na patogenicidade de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C / Iashilei Cassieli Pasquini. -- Jaboticabal, 2020
59 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Jesus Aparecido Ferro

1. Microorganismos fitopatogênicos. 2. Fatores de virulência. 3. Cancro (Fitopatologia). 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE GENES POTENCIAMENTE ENVOLVIDOS
NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* TIPO C

AUTORA: IASHILEI CASSIELI PASQUINI

ORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO

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

Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO (Participação Virtual)
Departamento de Tecnologia / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. FABRICIO JOSÉ JACIANI (Participação Virtual)
Fundo de Defesa da Citricultura / FUNDECITRUS - Araraquara/SP

Pesquisadora Dra. FLAVIA MARIA DE SOUZA CARVALHO (Participação Virtual)
Imprensa Biotecnologia / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 06 de novembro de 2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Iashilei Cassieli Pasquini - Nascida em 15 de fevereiro de 1995, natural de Catanduva, São Paulo, Brasil. Filha de Emilio Marcos Pasquini e Izildinha Donizethe Rebeque. Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) de Jaboticabal em março de 2014. Durante o curso de graduação fez iniciação científica na área de biologia molecular junto ao departamento de Tecnologia da FCAV. Em março de 2018 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária - FCAV/UNESP. Durante o Mestrado desenvolveu projetos e atividades científicas sob a orientação do Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro e coorientação da Dr^a. Helen Alves Penha. O trabalho foi realizado no Departamento de Tecnologia desta mesma Faculdade e contou com o apoio do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBio), e o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com a concessão de bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por Seu amor ágape, por ser constantemente meu abrigo, amparo, e por permitir que este sonho se realizasse.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agropecuária, Prof. Dr. Roberto Alves de Oliveira e ao Conselho, pela confiança à minha pessoa e por permitir a minha participação no curso de Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro por me aceitar em seu laboratório desde 2015. Serei eternamente grata por todas as oportunidades, ensinamentos e conselhos.

À Prof.^a Dr.^a Maria Inês Tiraboschi Ferro, pelo acolhimento e confiança a mim depositada em muitos momentos durante este processo. Obrigada por me acalmar, aconselhar e por não medir esforços para me ajudar em todas às vezes necessárias. Serei sempre muitíssimo grata à senhora.

À minha coorientadora e amiga, Helen Alves Penha, por me ensinar seus conhecimentos sempre com paciência e amor. Pela oportunidade em participar de sua equipe desde a Iniciação Científica. Sou imensamente grata por segurar a minha mão frente às dificuldades que tive durante o caminhar. Não há palavras que possam mensurar tamanha gratidão.

Aos amigos que fiz no LBM por me ajudarem inúmeras vezes discutindo resultados, protocolos e por todos os ensinamentos durante esse tempo. Luís, Flávia, Rafael, Bruno, Michelli, Amanda, Michelle, Ana, Tamires, Julie, Catarina, Daniele, Jéssica, Heloisa, Luana, Flavinha, Wallynson, Felipe, Fernando, Juan, obrigada pelo ótimo convívio, companheirismo e amizade.

Às amigas e equipe do Crebio, Agda, Mariza, Daniele e Célia, agradeço pela amizade, serviços prestados e por me ajudarem sempre.

Aos meus pais, Izildinha e Emilio, por todo incentivo e apoio ao decorrer da vida. Sou grata e abençoada por tê-los como referência de força, dedicação, integridade e amor. Espero um dia conseguir retribuir tudo que fizeram por mim. Os amo incondicionalmente!

À minha avó Rosa, por sempre orar e interceder pela minha vida. Por todos os conselhos e cuidados em dias difíceis. É uma dádiva poder contar com sua presença e amor em mais uma conquista.

Ao meu melhor amigo e companheiro, Gabriel, por caminhar ao meu lado e não permitir que eu desistisse ou desanimasse durante o processo. Sou grata por todo amor, compreensão e incentivo.

À minha melhor amiga Laira, por me ouvir, me incentivar, e acreditar que era possível e eu seria capaz. Agradeço por todos os momentos que vivemos e que fizeram essa jornada ser mais fácil e feliz.

À cada pessoa que contribuiu de alguma forma para realização e conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

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

SUMÁRIO

	Página
Certificado da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio)	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Xanthomonas</i> causadoras de doenças cítricas: ênfase em <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> tipo C.....	3
2.2 Interação planta patógeno: aspectos gerais.....	5
2.3 Patogenoma de <i>Xanthomonas</i> causadoras de doenças cítricas: ênfase em <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i> tipo C	6
2.4 Importância do “screening” in vivo de uma biblioteca de mutantes na identificação de genes relacionados à processos patogênicos.....	10
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Planejamento e direcionamento da metodologia	15
4.2 Cepas bacterianas, meios de cultura, plantas e condições de cultivo	15
4.3 Teste de Patogenicidade <i>in vivo</i> – “screening” da biblioteca de mutantes.....	16
4.4 Identificação dos genes mutados.....	17
4.4.1 Extração e quantificação de DNA genômico total de mutantes de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>aurantifolii</i>	17
4.4.2 PCR inversa.....	17
4.5 Análise da expressão gênica do mutante $\Delta XAUC_36880$	18
4.5.1 Extração de RNA total de XauC em estágio infectante.....	18

4.5.2 Síntese de cDNA e RT- PCR	19
4.6 Curva de crescimento bacteriano <i>in planta</i>	20
4.7 Curva de crescimento bacteriano <i>in vitro</i> em meio de cultura NBY e em meio de cultura XVM2 para os mutantes $\Delta XAUC_30580$ e $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$).	21
4.8 Teste de auto agregação de XauC selvagem e mutante	21
4.9 Testes da motilidade “Twitching” do mutante $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$).	22
4.10 Produção de Biofilme em meio de cultura NBY e em XVM2 para os mutantes $\Delta XAUC_30580$ e $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$).	22
4.11 Formação de goma xantana.....	23
4.12 Análise estatística.....	24
5 RESULTADOS	24
5.1 Avaliação da patogenicidade de XauC <i>in planta</i>	24
5.2 Identificação das regiões genômicas mutadas	26
5.3 PCR inversa.....	26
5.3.1 Análise <i>in silico</i> das regiões mutadas	28
5.4 Resultados da RT- PCR.....	33
5.5 Análise das curvas de crescimento dos mutantes de XauC <i>in vitro</i> e <i>in planta</i> ..	35
5.6 Avaliação da formação de biofilme e capacidade de autoagregação bacteriana	38
5.7 Análise da motilidade bacteriana tipo “Twitching”	40
5.8 Formação de goma xantana	41
5.9 Síntese dos resultados.....	42
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS.....	50

Certificado da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio)

A Comissão Interna de Biossegurança aprovou o desenvolvimento do projeto intitulado “PRODUÇÃO E ANÁLISE *IN PLANTA* DE UMA BIBLIOTECA DE MUTANTES DE *Xanthomonas fuscans* SUBSP. *aurantifolii* TIPO C (XAUC)”

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE GENES POTENCIALMENTE ENVOLVIDOS NA PATOGENICIDADE DE *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C

RESUMO- O conhecimento sobre o repertório de genes e suas funções 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* tipo 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-Citrus*. Assim, uma biblioteca de mutantes da bactéria XauC construída pela inserção aleatória do transposon Tn5 foi analisada *in vivo* quanto aos sintomas alterados da cancrose após inoculação em folhas do hospedeiro lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*). Três mutantes mostraram alterações em relação aos sintomas clássicos da doença e o local da inserção do transposon foi determinada por sequenciamento. Curvas de crescimento *in vivo* e *in vitro*, análise de formação de colônias, motilidade, adesão celular, formação de LPS e agregação celular dos mutantes selecionados foram analisados para avaliar a possível interferência destes processos na patogenicidade de XauC. Comprovou-se que um dos genes, o *XAUC_12280*, que codifica uma adesina (a qual funciona como fator de anti-retração do pilus), tem relação direta com a motilidade tipo "twitching" e a produção de LPS em processo infeccioso. Outro gene, o *XAUC_30580*, que codifica a enzima fumarilacetoacetato hidrolase – FAH, até agora não havia sido relatado como envolvido na virulência de *Xanthomonas* que infectam citros. Ainda, houve a interferência de uma mutação em uma região intergênica ao acesso à algum gene importante para a patogenicidade de XauC. Os novos genes encontrados neste estudo contribuem para um melhor entendimento da biologia da interação XauC-*Citrus*.

Palavras-chave: Biblioteca de mutantes; Cancrose cítrica, Virulência, *Xanthomonas*

IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF GENES POTENTIALLY INVOLVED IN *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* type C PATHOGENICITY

ABSTRACT - The knowledge about the repertoire of genes and their functions in species of 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* type C (XauC), which causes type C cancer, can infect only two species of citrus due to the variation in the virulence profile and genes present in 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, a library of mutants of the XauC bacterium constructed by the random *in vivo* insertion of the transposon Tn5 was analyzed for altered symptoms of cancroise after inoculation in leaves of the acid lime host 'Galego' (*Citrus aurantifolia*). Three mutants showed changes about the classic symptoms of the disease and the location of the transposon insertion was determined by sequencing. Growth curves *in vivo* and *in vitro*, colony formation analysis, motility, cell adhesion, LPS formation, and cell aggregation of the selected mutants were analyzed to assess the interference in these processes related to XauC pathogenic processes. The gene *XAUC_12280*, which encodes an adhesin (which works as a pilus anti-retraction factor), is directly related to twitching motility and the production of LPS in an infectious process. Another gene, *XAUC_30580*, which codes for the enzyme fumarylacetoacetate hydrolase - FAH, until now had not been reported to be involved in the virulence of *Xanthomonas*. Still, there was an interference of a mutation in an intergenic region to access some gene important for the pathogenicity of XauC. The new genes found in this study contribute to a better understanding of the biology of the XauC-*Citrus* interaction.

Keywords: Mutant Library, Citrus Canker, Virulence, *Xanthomonas*

Lista de Figuras

Figura 1 - Teste de patogenicidade do mutante $\Delta XAUC_{30580}$ e da estirpe selvagem (XauC W) inoculados na concentração de 10^8 UFC/mL em folhas de *C. aurantifolia*. A foto documentação ocorreu 24 dias após a inoculação (DAI). (A) superfície adaxial da folha; (B) superfície abaxial da folha.

Figura 2 - Teste de patogenicidade do mutante $\Delta PilY1$ e da estirpe selvagem (XauC W) inoculados na concentração de 10^8 UFC/mL em folhas de *C. aurantifolia*. A fotodocumentação ocorreu 24 dias após a inoculação (DAI). (A) superfície adaxial da folha; (B) superfície abaxial da folha.

Figura 3 - Teste de patogenicidade do mutante $\Delta XAUC_{36880}$ e da estirpe selvagem (XauC W) inoculados na concentração de 10^8 UFC/mL em folhas de *C. aurantifolia*. A fotodocumentação ocorreu 24 dias após a inoculação (DAI). (A) superfície adaxial da folha; (B) superfície abaxial da folha.

Figura 4 - **A)** Resultado da digestão do DNA total dos mutantes $\Delta XAUC_{36880}$ e $\Delta XAUC_{30580}$ com a enzimas de restrição *EcoRI*. **1-** Mutante $\Delta XAUC_{36880}$ íntegro. **2-** Mutante $\Delta XAUC_{36880}$ digerido com *EcoRI* (Thermo); **3-** Mutante $\Delta XAUC_{30580}$ íntegro. **4-** Mutante $\Delta XAUC_{30580}$ digerido com *EcoRI* (Thermo). **B)** Resultado da digestão do DNA total do mutante $\Delta XAUC_{12280}$ com a enzimas de restrição *EcoRI*. **1-** Mutante $\Delta XAUC_{12280}$ íntegro. **2-** Mutante $\Delta XAUC_{12280}$ digerido com *EcoRI* (Thermo); **L-** marcadores de peso molecular *Gene Ruler* 1Kb (Fermentas). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% a 0,4 V/cm.

Figura 5 - Sequência nucleotídica do gene que codifica uma proteína da superfamília fumarilacetoacetato hidrolase, e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu entre as bases 227 e 228, indicada pelo triângulo vermelho, entre a segunda e a terceira base do códon CCA da tirosina.

Figura 6 - Sequência de aminoácidos da proteína fumarilacetoacetato hidrolase, e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu no aminoácido 76, uma Prolina (P), como pode ser observado pelo triângulo vermelho.

Figura 7- Metabolismo da tirosina da espécie *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Em destaque, verificamos a via de biossíntese de tirosina e, indicado pela seta, o gene XAC3609 (*uptA*), o qual teve seu gene homólogo em XauC mutado.

Figura 8 - Sequência nucleotídica do gene *XAUC_{12280}* ($\Delta PilY1$), e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu entre as bases 2.466 e 2.467, indicada pelo triângulo vermelho.

Figura 9 - Sequência de aminoácidos do gene *XAUC_{12280}* ($\Delta PilY1$), e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu entre uma Arginina (R) e uma Tirosina (Y), como pode ser observado pelo triângulo vermelho.

Figura 10 - Sequência nucleotídica da região intergênica situada entre os genes *XAUC_36870* e *XAUC_36880* e, local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu entre as bases 723 e 724, indicada pelo triângulo vermelho.

Figura 11 - Demonstração do transposon inserido na região entre os genes *XAUC_36870* e *XAUC_36880*.

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% para os produtos resultantes da RT-PCR com os primers que amplificam o gene *RNA pirofosfohidrolase* em um fragmento com 573 pares de base (*XAUC_36880*). **1)** Padrão de peso molecular Gene Ruler 1Kb Plus DNALadder (Fermentas); **2)** fragmento amplificado usando como molde o cDNA da estirpe selvagem XauC; **3)** fragmento amplificado usando como molde o cDNA do mutante $\Delta XAUC_36880$; **4)** controle negativo das amostras.

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% para os produtos resultantes da RT-PCR com os “primers” que amplificam o gene *rpsI* e os RNAs transportadores – tRNA(Gln) e tRNA(Met). **1-2:** Bactéria selvagem e mutante $\Delta XAUC_36880$, respectivamente, utilizando os primers F1_36880 e R1_36880; **3-4:** Bactéria selvagem e mutante $\Delta XAUC_36880$, respectivamente, utilizando os primers F_tRNA-Gln e R1_tRNA-Gln; **5-6:** Bactéria selvagem e mutante $\Delta XAUC_36880$, respectivamente, utilizando os primers F_tRNA-Met e R1_tRNA-Met; **C)** controle negativo das amostras; **L)** Padrão de peso molecular Gene Ruler 1Kb Plus DNALadder (Fermentas).

Figura 14 - **A)** Curvas de crescimento dos três mutantes de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C e estirpe selvagem *in vitro* em meio de cultura rico; **B)** Curva de crescimento do mutante $\Delta XAUC_12280$ e XauC W *in planta*; **C)** Curva de crescimento do mutante $\Delta XAUC_30580$ e XauC W *in planta*; **D)** Curva de crescimento do mutante $\Delta XAUC_36880$ e XauC W *in planta*. A coleta das amostras ocorreu nos dias 0, 1, 3, 9, 15, 20 e 25 após inoculação.

Figura 15 - Curvas de crescimento bacteriano *in vitro* em XVM2 do mutante $\Delta XAUC_30580$ e XauC selvagem (XauC W).

Figura 16 - Curvas de crescimento bacteriano *in vitro* em XVM2 do mutante $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$), e XauC selvagem (XauC W).

Figura 17 - Quantificação da formação de biofilme *in vitro* em meio de cultura NBY pela XauC e pelos mutantes $\Delta XAUC_30580$, $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$), e $\Delta XAUC_36880$ por meio da leitura da densidade ótica (DO595nm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 18 - Quantificação da formação de biofilme *in vitro* em meio de cultura XVM2 pela XauC W e pelos mutantes $\Delta XAUC_30580$, $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$), por meio da leitura da densidade ótica (DO595nm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 19 - Quantificação da auto-agregação bacteriana da estirpe selvagem de XauC e os mutantes $\Delta XAUC_{30580}$, $XAUC_{12280}$ ($\Delta PiIY1$) e $\Delta XAUC_{36880}$, respectivamente, através das leituras de densidade ótica (DO 600nm) após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Figura 20 – A) Ensaios da motilidade “Twitching” na superfície de placas de Petri, coradas com cristal violeta (0,3%); **B)** Gráfico demonstrando a redução significativa ($p < 0,05$) da motilidade “Twitching” do mutante $XAUC_{12280}$ ($\Delta PiIY1$), frente a estirpe selvagem da bactéria. Os dados utilizados correspondem à mensuração das áreas abrangidas pela motilidade “Twitching”. O experimento foi realizado em triplicatas biológicas e técnicas.

Figura 21: Produção de goma xantana da estirpe selvagem (XauC W) e os mutantes $\Delta XAUC_{30580}$, $\Delta XAUC_{12280}$ ($PiIY1$) e $\Delta XAUC_{36880}$, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Lista de Tabelas

Tabela 1: "Primers" utilizados para amplificação individual dos genes e os RNAs transportadores *tRNA-Gln* e *tRNA-Met*, respectivamente.

Tabela 2: Análise das amostras de DNA: verificação da qualidade e estimativa de concentração do DNA digerido e purificado dos mutantes $\Delta XAUC_30580$, $\Delta XAUC_36880$ e $\Delta XAUC_12280$.

Tabela 3: Análise das amostras de DNA: verificação da qualidade e estimativa de concentração das amplificações para o sequenciamento dos mutantes $\Delta XAUC_30580$, $\Delta XAUC_36880$ e $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$).

Tabela 4: Comparação dos resultados entre os mutantes $\Delta XAUC_30580$, $\Delta XAUC_12280$ (*PilY1*) e $\Delta XAUC_36880$ em relação a estirpe selvagem.

1 INTRODUÇÃO

A cancrose tipo C é causada pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C (XauC) e possui como principal hospedeiro a lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*), porém XauC ainda pode ser encontrada colonizando outros hospedeiros como o citrumelo “Swingle”, (Civerolo, 1984; Jaciani et al., 2009; Jalan et al., 2014). A bactéria adentra a planta por meio de pequenas aberturas, como ferimentos e/ou estômatos e, nas plantas hospedeiras que não possuem os genes de resistência aos efetores bacterianos, há o desenvolvimento da doença, caracterizando esta relação conhecida como interação compatível (Grewal et al., 2012).

Ao colonizarem a lima ácida ‘Galego’, os isolados de XauC são capazes de ocasionar o aumento da célula hospedeira provocando extravasamento do conteúdo celular resultando na morte do tecido foliar e consequentemente áreas necróticas de aparência eruptiva podem ser observadas no processo infeccioso e, geralmente, apresentam a formação de anéis cloróticos embebidos em água, denominados encharcamento, bem próximos a área necrosada. Estes sintomas podem se fazer presentes em caules, folhas e frutos (Stall e Seymour, 1983; Brunings e Gabriel, 2003; Moreira et al., 2004). Por outro lado, as variedades de laranja doce são resistentes à cancrose C e, quando inoculadas com XauC apresentam uma reação de hipersensibilidade (HR), causando morte celular programada local (apoptose) e abscisão das folhas afetadas devido ao efector *XopAG* (Gochez et al., 2016).

Visando o conhecimento do repertório de genes existentes em XauC, o primeiro sequenciamento (parcial) foi realizado em 2010 por Moreira et al. e, recentemente, dados do genoma de mais cinco isolados de XauC foram disponibilizados, sendo dois completos (Fonseca et al., 2019). A análise comparativa entre os genomas de XauC e outras *Xanthomonas* revelou que XauC não possui diversos genes-chave dos processos de patogenicidade e virulência presentes em *X. citri* pv. *citri* (Xac), a bactéria causadora do cancro cítrico tipo A. Esta diferença pode explicar a predominância de Xac nos cultivares de citros, assim como a maior agressividade comparado às espécies causadoras da cancrose tipo B e C (Fonseca

et al., 2019). A comparação de dados genômicos de outras *Xanthomonas* disponíveis em bancos de dados com o genoma de XauC têm o potencial de trazer novos conhecimentos para a base molecular do cancro e cancriose de citros, bem como a sua história evolutiva.

Muitos genes de XauC não apresentam função definida e, ainda, poucos foram analisados quanto à possível relação com processos patogênicos. Ainda, não existem estudos publicados que visaram a descoberta de novos genes relacionados à patogenicidade e virulência no genoma de XauC.

Uma das ferramentas que possibilita a análise funcional em larga escala desses genes é a confecção 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. Busca-se, à priori, mudanças nos sintomas do desenvolvimento da doença seguido da análise de formação de colônias, motilidade, adesão celular, formação de LPS e agregação celular dos mutantes selecionados, sintomas estes relacionados à processos de patogenicidade e virulência.

O uso da mutagenese através da inserção aleatória de transposons no genoma tornou-se frequente e amplamente utilizada no estudo de função gênica de diversos microorganismos (Lagerme et al., 2016; Okshevsky et al., 2018; Endres et al., 2019), inclusive proporcionou e ainda contribui com avanços na compreensão sobre a patogenicidade e virulência de Xac (Laia et al., 2009; Yan e Wang, 2012; Vieira et al., 2017).

Uma vez que são escassos os estudos sobre os mecanismos de ação e defesa do patossistema XauC-Citrus e que não existem estudos publicados que descrevam a descoberta de genes relacionados à patogenicidade e virulência no genoma XauC, foi analisada, no presente trabalho, uma biblioteca de mutantes de XauC, cepa ICPB 10535.

Esta abordagem representa um avanço no conhecimento não somente da XauC, mas também do patossistema *Xanthomonas-Citrus*. Estas informações podem levar ao desenvolvimento de estratégias moleculares para o controle da Xac, a bactéria causadora do cancro cítrico, o que levaria à um aumento da produção de citros em detrimento desta doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Xanthomonas* causadoras de doenças cítricas: ênfase em *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C

O Brasil é destaque internacional no ramo do agronegócio, sendo líder mundial na citricultura como apontado pelo relatório de produção de laranjas referentes à safra 2019/2020 (USDA, 2020). Entretanto, mesmo ocupando as primeiras posições nos rankings de produção, durante a última safra foi registrada a maior taxa de queda dos frutos desde 2015, chegando a 17,63% segundo a PES e, dentre as principais causas, o cancro cítrico foi responsável pela perda de um milhão e 800 mil caixas de frutos (Fundecitrus, 2020).

De acordo com o agente etiológico e o grau de agressividade, o cancro cítrico pode ser classificado em três diferentes 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* tipo B (XauB) e *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C (XauC), respectivamente, se manifestam de forma menos agressiva, e seus agentes etiológicos afetam poucas espécies cítricas.

As primeiras descrições de uma cancrose dos citros capaz de afetar uma limitada gama de hospedeiros - *Citrus sinensis* (laranja doce), *Citrus limon* (L.) Burm. (limão siciliano), e *Citrus paradisi* (pomelo) - datam de 1934 na Argentina, até então denominada “falsa cancrose”. Anos depois houve a indicação de que essa falsa cancrose fosse denominada como cancrose B ou cancrose sul-americana, visando uma distinção do cancro cítrico até então chamado de cancrose A ou cancrose asiática (Fawcett e Bitancourt, 1940; Civerolo, 1984). Atualmente sabe-se que a cancrose tipo B já pode ter sido erradicada em seu país de origem e em outros atingidos pela doença, Paraguai e Uruguai, resultante da concorrência com a Xac (Civerolo, 1984; Chiesa et al., 2013). Só em 1963 surgiram relatos de uma cancrose que afetava apenas a lima ácida ‘Galego’ (*Citrus aurantifolia*), restrito ao estado de

São Paulo e, após diversos testes fisiológicos, morfológicos, sorológicos e patogênicos, observou-se que essa bactéria diferenciava-se das causadoras do cancro cítrico a nível intraespecífico e dessa forma foi avaliada como uma forma peculiar da Xac e a nomenclatura sugerida na época foi *Xanthomonas citri* forma *specialis aurantifolia* (Namekata, 1971). Posteriormente, em 1977, a doença foi nomeada como cancro C (Rosseti, 1977) e para o agente etiológico foi proposta a nomenclatura *Xanthomonas campestris* pv. *aurantifolii* (Gabriel et al., 1989).

Vauterin e colaboradores propuseram em 1995, após análises de parentesco, que a nova nomenclatura fosse *X. axonopodis* pv. *aurantifolii*. Em 2005, Schaad e colaboradores propuseram *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* tipo C como a nova nomenclatura ao patógeno responsável pelo cancro cítrico tipo C. Recentemente, mudanças foram propostas na taxonomia de *Xanthomonas* e um novo nome foi sugerido, *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C (XauC), levando em consideração análises de sequências multilocus (MLSA) e fenotípicas (Constantin et al., 2016), sendo a nomenclatura utilizada no presente trabalho.

Atualmente a cancrose do tipo C continua limitada ao estado de São Paulo e possui sintomas muito semelhantes ao cancro cítrico quando as XauC infectam folhas do hospedeiro lima ácida 'Galego' (*C. aurantifolia*) e do hospedeiro citrumelo 'Swingle' (*C. paradise* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) (Jaciani, 2012; Jalan et al, 2014). Morfologicamente, XauC é uma bactéria gram-negativa que apresenta colônias com coloração amarelada devido à presença de xantomonadina, possui flagelo, formato de haste e aspecto mucóide devido à produção de goma xantana.

A cancrose C pode ser identificada por diversas maneiras, além da observação dos sintomas típicos. Entre as técnicas, estão o isolamento de XauC em meio sólido a partir de lesões existentes seguido de análise das colônias, uma vez que alguns isolados de XauC quando cultivados em meio de cultura sólido apresentam como característica pigmentação escura (Gottwald et al., 2002; Jaciani., 2012; Behlau e Belasque, 2014). Ainda, é possível realizar testes de patogenicidade em espécies susceptíveis e resistentes infiltrando uma suspensão bacteriana), realizando observação dos sintomas entre 2 a 4 dias após infiltração na porção inoculada da folha (Behlau e Belasque, 2014). Além de análises morfológicas e fenotípicas, detecções moleculares podem auxiliar na identificação do patógeno e,

entre os trabalhos já realizados, Fonseca e colaboradores (2019) desenvolveram oligonucleotídeos (“primers”) específicos para a identificação e diferenciação entre Xac, XauB, XauC e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, causadora da mancha bacteriana dos citros.

2.2 Interação planta patógeno: aspectos gerais

Todas as plantas possuem imunidade natural a uma gama de microrganismos e a maquinaria responsável por garantir essa proteção é denominada de mecanismos de resistência ‘não hospedeira’. Esses mecanismos são conservados evolutivamente e incluem fatores estruturais e bioquímicos como o controle da movimentação estomática e a produção de compostos tóxicos aos microrganismos, respectivamente. Se um microrganismo consegue ultrapassar essas barreiras físico-químicas advindos da resistência ‘não hospedeira’ ele e a planta são considerados, respectivamente, como fitopatógeno e hospedeira, dando origem à interação planta-patógeno (Camargo, 2011). Essa interação resulta em ações na planta para o reconhecimento do fitopatógeno e ativação dos mecanismos de defesa os quais, consequentemente, são responsáveis por ativar a maquinaria do agente patogênico. Estes então são capazes de manipular a biologia do hospedeiro, estabelecendo-se para completar seu desenvolvimento e reprodução. Estes processos resultam de uma coevolução genética entre plantas e fitopatógenos, possibilitando essa interação (Boyd et al., 2013).

As plantas possuem dois mecanismos moleculares utilizados na defesa contra os agentes patogênicos. O primeiro deles acontece na face externa da célula hospedeira e, logo em seguida, através do contato da planta com o patógeno por meio das PAMPs ou MAMPs [“Pathogen (or Microbe) – Associated Molecular Patterns”], que são identificadas através de proteínas de reconhecimento padrão – PPR (“Pattern Recognition Receptors”) da planta. Esse reconhecimento libera respostas gerais de defesa das plantas, as quais recebem o nome de PAMP – PTI (PAMP “triggered immunity”). Ainda que a resposta basal da planta esteja ativa, o fitopatógeno é capaz de suprimir os diversos componentes da PTI por meio de proteínas efetoras injetadas na planta, iguais às proteínas efetoras bacterianas

secretadas pelo sistema de secreção tipo III (Lahaye., Bonas, 2001; Kim et al., 2011).

O segundo método que a planta utiliza para sua defesa inclui o reconhecimento de proteínas efetoras específicas do patógeno, nomeadas como proteínas de avirulência (avr) e reconhecidas pelos receptores intracelulares da planta denominados proteínas de resistência (genes R). Esse reconhecimento resulta na resposta de imunidade desencadeada por efetores – ETI (“Effector triggered immunity”), habitualmente conhecida como Teoria Gene a Gene (Cui et al., 2009; Boyd et al., 2013). Neste tipo de interação não há indução dos sintomas, uma vez que o hospedeiro está com sua maquinaria de defesa ativada, impossibilitando o desenvolvimento do fitopatógeno (Daurelio et al., 2013). Conhecida como resposta de hipersensibilidade (HR), essa interação estimula a morte celular localizada, gerando lesões necróticas, as quais mantêm e limitam o patógeno no local onde ocorreu a infecção. Além desses sintomas visíveis, podem acontecer mudanças estruturais, acúmulo intracelular de proteínas relacionadas com a patogênese e expressão dos fatores de transcrição responsáveis por ativar os genes das plantas, caracterizando a resposta do hospedeiro (Oh et al., 2008; Mur et al., 2008; Daurelio et al., 2013). Esta interação é a que ocorre entre *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C (XauC) e a maioria dos citros que possuem importância comercial.

Todavia, nas plantas susceptíveis, as quais não possuem os genes de resistência aos efetores bacterianos, há o desenvolvimento da doença e essa relação é conhecida como interação compatível (Grewal et al., 2012). A interação compatível é a que ocorre entre XauC e as espécies lima ácida ‘Galego’ e citrumelo ‘Swingle’ ocorrendo, portanto, o desenvolvimento da cancrose tipo C.

2.3 Patogenoma de *Xanthomonas* causadoras de doenças cítricas: ênfase em *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C

Xanthomonas citri pv. *citri* (Xac) é membro da família *Xanthomonadaceae*, um dos maiores e mais importantes grupos de fitopatógenos bacterianos, e tem sido utilizada como organismo modelo para o estudo da patogênese e filogenia. As investigações do patogenoma de Xac forneceram informações valiosas como: (a) as

especificidades em seus hospedeiros; (b) o processo de reconhecimento planta-hospedeiro; (c) os meios pelos quais a maquinaria celular de uma planta hospedeira é alterada pelo patógeno para facilitar a infecção e; (d) a propagação e disseminação do patógeno.

Assim, o conhecimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na interação das *Xanthomonas* e espécies cítricas elucidada a história evolutiva da interação destes microrganismos com seus hospedeiros, podendo levar à estratégias moleculares de controle do cancro. O sequenciamento de genomas destas bactérias e a identificação de genes envolvidos neste processo são passos fundamentais para a elucidação destes mecanismos. Nesse intuito, em 2002 foi realizado o primeiro sequenciamento completo do genoma de *Xanthomonas citri* pv. *citri* isolado 306 (Xac 306) (da Silva et al.), e posteriormente outros diversos isolados de Xac foram sequenciados (Zhang et al., 2015; Gordon et al., 2015; Patané et al., 2019).

Em 2010, Moreira e colaboradores disponibilizaram o genoma parcial de dois isolados de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*, 11122 e 10535 (tipos B e C, respectivamente) e, recentemente, Fonseca et al. (2019) sequenciaram sete novos genomas de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* sendo dois de XauB – isolados 1561 e 1566 (completos) e cinco (dois completos) de XauC – isolados 535, 763, 867, 1559 e 1609.

Análises filogenéticas dos genomas acima citados, 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. Ainda, 62 genes efetores do Sistema de Secreção Tipo 3 (SST3) são variáveis quanto à presença/ausência e status como pseudogenes, dentre as 31 sequências genômicas analisadas (Fonseca et al., 2019). Dentre esses 62 genes, o *XopS* foi indicado como o único gene efetor presente no clado *Citri* – *Citri* (ausente no clado *aurantifolii*), sendo relacionado com a sintomatologia e crescimento bacteriano e, além disso, é capaz de suprimir a expressão do gene de defesa vegetal desencadeado pelas PAMPs (Schulze et al., 2012; Fonseca et al., 2019). O gene *XopF1* em *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 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, inclusive, o SST4 cromossômico demonstrou ter envolvimento na morte bacteriana (Jacob et al., 2014; Souza et al., 2015). Os genes do SST4 estão arranjos 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). Este é descrito como um agrupamento de células bacterianas envoltas por uma matriz feita pela própria comunidade bacteriana, aderida a uma superfície (Costerton et al., 1995; Crossman; Dow, 2004; Li; Wang, 2011).

A formação de biofilme nestas *Xanthomonas* ocorre inicialmente quando as células planctônicas geram respostas a sinais extra ou intracelulares, como sinais difusíveis (Diffusible Signal Factor – DSF) ou nutrientes, e se movimentam até a superfície adequada onde, através de proteínas adesinas, as células permanecem aderidas (Gottig et al., 2009; Guo et al., 2011; Dunger et al., 2014). Uma vez que as bactérias aderidas tenham uma boa fonte oxigênio e nutrientes, torna-se propícia a divisão celular e, devido à essa proliferação, as bactérias espalham-se pela superfície realizando a motilidade através de flagelo e/ou *pili* tipo IV para desenvolver uma monocamada de células aderidas à superfície (Guzzo et al., 2009; Malamud et al., 2011; Dunger et al., 2014).

A divisão celular continua e as células começam a se agrupar umas sobre as outras compondo uma microcolônia, possivelmente restringindo o acesso ao oxigênio e aos nutrientes à camada superior. Consequentemente, os sistemas reguladores *Co/S/Co/R* responsáveis pela expressão exacerbada de EPS pelas células da base da microcolônia são ativados (Rigano et al., 2007; Yan; Wang,

2011). Concomitantemente, há secreção de proteínas e lipopolissacarídeos, possibilitando a adesão célula-célula, a qual resulta no crescimento vertical da microcolônia, favorecendo o acesso aos nutrientes e oxigênio, concretizando assim o estabelecimento de macrocolônias e da matriz do biofilme maduro (Barken et al., 2008; Li; Wang, 2011; Petrocelli et al., 2012; Li; Wang, 2012).

Como descrito acima, 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 “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).

Além disso, a ausência do gene homólogo XAC2670, possivelmente responsável pela biossíntese de alginato (EPS com relação à formação de biofilme por bactérias do gênero *Pseudomonas*) em XauC é 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 (Fonseca et al., 2019).

Em outros organismos o gene XAC1818, o qual é responsável por codificar a hemaglutinina, foi descrito como essencial para o processo de virulência (Gottig et al., 2009; Caserta et al., 2010; Voegel et al., 2010). Os genes *hmsHFR-hp* (XAC183-1810) foram relatados como genes relacionados na adaptação e virulência, homólogos aos genes *pgsABCD* em *E. coli* (Wang et al., 2004). Dessa maneira, a não presença dos genes XAC1810-XAC1819, como citado anteriormente, pode estar relacionada à diminuição da capacidade de colonizar os tecidos da planta hospedeira (Fonseca et al., 2019).

A limitação da gama de hospedeiros de XauC pode ser relacionada a um gene homólogo ao *AvrGf1* (*AvrGf2*), pertencente a família de efetores XopAG. Esse mecanismo foi elucidado caracterizando-se o efector XopAG o qual, no domínio C-terminal, possui o motivo conservado CLNAXYD. Mutações nesse domínio presente

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., 2016). Todavia, mais estudos são necessários para determinar o papel de CLNAXYD na interação com as proteínas do hospedeiro no que tange à resposta de hipersensibilidade. 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). *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).

Dos 4463 genes revelados no sequenciamento de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C ICPB 10535 (NCBI, 2020), sabemos pouco sobre os genes que estão relacionados ao processo infeccioso no hospedeiro; entretanto há ainda 432 genes hipotéticos a serem investigados, dentre os quais podem estar genes-chave deste processo.

2.4 Importância do “screening” in vivo de uma biblioteca de mutantes na identificação de genes relacionados à processos patogênicos

A compreensão sobre as particularidades dos mecanismos patogênicos de fitopatógenos pode levar ao desenvolvimento de novas ferramentas, tanto para a prevenção como para o controle de doenças bióticas em plantas.

Estes mecanismos variam desde a secreção de enzimas e polissacarídeos visando à fixação e colonização da planta hospedeira até a secreção de toxinas capazes de mascarar ou reprimir todo o aparato de defesa da planta, incluindo uma elaborada rede de interação de proteínas que atuam em processos de patogenicidade e virulência bacteriana (White et al., 2000). Assim, a identificação de genes que codificam estas proteínas, juntamente com a caracterização de suas funções, possuem papel fundamental no entendimento destes processos. Uma das

abordagens tradicionalmente utilizada para a realização de estudos de identificação de genes envolvidos em processos patogênicos é construção de uma biblioteca de mutantes através da inserção aleatória de transposons seguida de “screening” dos mutantes *in planta*. Esse método possibilita, além da descoberta de novos genes, a inferência da função destes genes, uma vez que uma mutação no genoma pode levar à alteração da expressão e/ou regulação de um ou mais genes, resultando na alteração do fenótipo do patógeno como, por exemplo, tornando a bactéria incapaz de se desenvolver em seu hospedeiro (Hamer et al., 2001).

O transposon Tn5 foi descoberto por Berg e colaboradores em 1975 como um produto colateral advindo de estudos relacionados a resistência à canamicina. Caracterizado por ser um dos primeiros transposons a ser identificado, o sistema Tn5 vem sendo utilizado como uma ferramenta produtiva e eficaz em estudos genéticos e moleculares (Berg, 1989; Reznikoff, 2002). Esse tipo de mecanismo viabiliza vários tipos de mutações como inserções (mais utilizada), deleções e inversões de genes (Berg et al., 1989; Reznikoff 2002, 2006).

O uso desta tecnologia já foi utilizado em alguns estudos em *Xanthomonas* causadoras de cancro cítrico, como será brevemente descrito a seguir. Laia et al. (2009) construíram uma biblioteca com ~10.000 mutantes do isolado Xac306, dos quais 3.300 foram submetidos à “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.

Os mutantes gerados por Laia e colaboradores foram base para vários outros estudos mais aprofundados sobre a relação planta-patógeno no que tange aos genes possivelmente relacionados à virulência e patogenicidade. Dentre eles, o estudo feito por Oliveira et al. (2018) foi desenvolvido com o mutante “18D5”, o qual possuía a ORF *XAC_RS22275* truncada e, quando inoculado em citros susceptível, percebeu-se a redução dos sintomas de necrose (Laia et al., 2009). A ORF *XAC_RS22275* é uma das duas ORFs encontradas em Xac, passageiros do *TnXax1* (transposon pertencente à família *Tn3*, correlacionado a evolução e surgimento da

patogenicidade em *Xanthomonas*), que codificam transglicosilases líticas de mureína (LTs) e a ação enzimática das LTs é responsável pela síntese, remodelagem e degradação da parede celular bacteriana, sendo esses fatores cruciais para a montagem do aparato do sistema de secreção tipo III (Oliveira et al., 2018).

Dentre os mutantes com genes interrompidos pelo transposon caracterizados como hipotéticos na biblioteca construída por Laia (2009), 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) além de, em condições infectantes, a proteína hipotética codificada pelo gene *XAC3981* teve sua expressão regulada positivamente, sugerindo que este gene possui um papel importante na virulência de Xac (Moreira et al., 2017).

Silva (2019) verificou ainda que o gene *XAC3981* pertence a um operon funcional presente no genoma de Xac306, constituído pelos genes *htrA-XAC3981-XAC3982-XAC3983*, diferente do que era predito até então por programas relacionados a predição de operons em procariotos e, além disso, obteve a constatação inédita que o gene *XAC3982* possivelmente tem sua função relacionada a uma proteína transmembrana, uma vez que a proteína codificada pelo gene *XAC3982* possui homologia com proteínas holinas, sendo estas uma classe de proteínas transmembranares.

Ainda, derivado da biblioteca de mutantes produzida por Laia (2009), Vieira et al. (2017) trabalharam com a ORF *XAC1201* a qual, sob interferência do transposon Tn5, já havia demonstrado anteriormente reduções na virulência de Xac quando inoculada em *C. limonia* Osbeck (Laia et al., 2009). Vieira (2017) conferiu que essa redução também ocorria ao inocular o mutante da ORF *XAC1201* em folhas de *C. sinensis* L. Osbeck. Desta forma, análises *in silico* e ensaios de motilidade foram realizados e revelaram que a proteína codificada pela ORF *XAC1201* possivelmente possui relação com motilidade flagelar, estando dessa forma relacionada com a virulência da bactéria (Vieira et al., 2017).

Em 2012, Qing Yan e Nian Wang desenvolveram uma biblioteca de Xac306 contendo aproximadamente 22.000 mutantes. Oitenta e dois genes foram identificados como envolvidos na contribuição dos sintomas de cancro, quando

foram inoculados em *C. paradise*. Destes, 23 genes demonstraram associação com processos essenciais, uma vez que a mutação reduziu drasticamente o crescimento bacteriano *in vitro* (meio de cultura). Outros 32 genes identificados já haviam sido descritos anteriormente como relacionados à processos de virulência, e dentre eles encontram-se genes implicados no SST3, sistema de detecção de *quorum*, efetores do SST3, síntese de polissacarídeos extracelulares e lipopolissacarídeos e vias metabólicas gerais. Nove genes tiveram sua contribuição aos processos patogênicos confirmadas após ensaios de complementação, são eles: *pthA4*, *trpG*, *hrpM*, *peh-1*, *purD*, *XAC1230*, *XAC3049* e *XAC1548*. Ainda, 27 novos genes compreendidos no processo de patogenicidade foram identificados e 11 deles, que não possuíam função conhecida anteriormente, podem estar potencialmente envolvidos nos mecanismos patogênicos de *Xac*.

Em *E. coli*, fazendo uso da mesma ferramenta, foram identificados genes que interferem na capacidade de crescimento em diferentes condições (Hare, et al., 2001). Um estudo mais recente das cepas ST131 que foram mutadas através do transposon Tn5, identificou 30 genes associados ao aumento da motilidade comparados com a cepa de referência ST131 EC958. Dentre esses genes, três deles (*mprA*, *hemK* e *yjeA*) apresentaram novos fatores que afetaram a motilidade. A mutação conferida pelo Tn5 acarretou no aumento da transcrição de genes flagelares (*flhD* e *fliC*), aumento na expressão da flagelina *FliC* e melhora na síntese de flagelos. Ainda, a inserção do Tn5 em regiões intergênicas no cromossomo EC958 foi associada a uma maior mobilidade (Kakkanat et al., 2017).

Através da análise de uma biblioteca contendo 23.312 mutantes de *Vibrio cholerae*, foi possível atribuir função a um dos genes hipotéticos – VC2208 (*flgT*) – como sendo essencial para a motilidade dessa bactéria (Cameron et al., 2008).

Sabendo da alta resistência a muitos antibióticos e a propensão ao desenvolvimento de resistência mutacional e/ou adaptativa, uma biblioteca de mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* foi analisada quanto à capacidade dos mutantes exibirem uma maior ou menor suscetibilidade à fluoroquinolona ciprofloxacina afim de revelar quais genes estavam ligados à resistência intrínseca e mutacional. Como resultado, 35 mutantes apresentaram suscetibilidade aumentada, enquanto 79 foram menos suscetíveis ao antibiótico (Breidenstein, et al., 2008).

Da mesma forma, sabendo-se da necessidade da melhor compreensão dos mecanismos de interação de XauC e seu hospedeiro, Mello construiu, em 2016, uma biblioteca contendo 672 mutantes de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C. Esta biblioteca serviu de base para o presente trabalho na identificação de genes correlacionados ao patossistema *Citrus*-XauC, visando gerar informações que futuramente poderão auxiliar na compreensão das interações do patossistema *Xanthomonas-Citrus*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e analisar genes relacionados à processos de patogenicidade e virulência de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C.

3.2 Objetivos específicos

- Testar a patogenicidade *in planta* de mutantes de uma biblioteca em planta susceptível;
- Identificar os genes cujos mutantes apresentaram sintomatologia *in planta* alterada;
- Avaliar se a mutação interferiu no crescimento celular *in vitro* e *in planta*;
- Avaliar se a mutação afetou a motilidade celular;
- Avaliar se a mutação interferiu na adesão celular;
- Avaliar se a mutação interferiu na formação de biofilme, goma xantana e agregação bacteriana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Planejamento e direcionamento da metodologia

É importante salientar que, após resultado do sequenciamento e análise *in silico*, alguns testes foram direcionados e específicos para alguns dos mutantes, considerando o gene mutado ou local de inserção do transposon.

4.2 Cepas bacterianas, meios de cultura, plantas e condições de cultivo

O presente trabalho utilizou como ferramenta de pesquisa a análise de uma biblioteca de mutantes do isolado XauC ICPB 10535 (Moreira et al., 2010) (XauC W – do inglês “Wild type”) feita por Mello (2016) através da inserção aleatória de transposons (EZ-Tn5 Transposome - EPICENTRE), a qual gerou 672 mutantes, dispostos em 7 placas do tipo Elisa, as quais estavam armazenadas em freezers com a temperatura de -80°C em meio NB (5 g de triptona, 3 g de extrato de carne e água destilada q.s.p. 1000 mL) contendo 8% de glicerol, nas dependências do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, situado no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – SP, Câmpus da UNESP.

O isolado XauC ICPB 10535 selvagem e os mutantes selecionados após o “screening” da biblioteca foram mantidos em estoques de água de torneira estéril, armazenados a temperatura ambiente, e também em meio 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% e armazenados a -80°C em um ultrafreezer. Para a realização dos experimentos, estas cepas foram cultivadas em meio de cultura sólido Ágar nutriente - NA (5 g de triptona, 3 g de extrato de carne, 15 g de ágar e água destilada q.s.p. 1000 ML) a 28°C, por 72 horas, ou através de uma massa bacteriana advinda de uma colônia isolada em meio de cultura líquido NBY complementado com 25 mL de glicose 1 M e 1 mL de $MgSO_4$ 1 M (por litro de meio) a 29°C, por 16 horas, a 180 rpm.

Para o preparo dos inóculos, após 16 horas de crescimento em 30 mL de meio NBY sob as mesmas condições citadas acima. Ao cultivo bacteriano de células

mutantes, houve o acréscimo de canamicina na concentração de 50 µg/mL, em ambos os meios, conforme sugerido pelo fabricante dos reagentes utilizados na geração dos mutantes (Epicentre). As culturas bacterianas, cuja concentração celular correspondia a 10^8 UFC/mL (OD600_{nm} igual a 0,3), foram centrifugadas a 4.000 x g, a 25°C por 15 minutos. O meio de cultura foi descartado e as células ressuspensas em água de torneira estéril. Para o teste de patogenicidade e curva de crescimento bacteriano *in planta*, foram utilizados exemplares de *C. aurantifolia*, popularmente conhecidos como lima ácida ‘Galego’. Durante os experimentos, as réplicas biológicas de cada teste foram mantidas em laboratório de segurança, nas dependências do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, com luz e temperatura controladas e mensuração da umidade ambiente.

4.3 Teste de Patogenicidade *in vivo* – “screening” da biblioteca de mutantes

Os mutantes advindos da biblioteca de *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* ICPB 10535 feita por Mello em 2016 foram cultivados, individualmente, em meio NA sólido acrescido de canamicina (50 µg/mL) por 72 horas a 29°C. Em seguida, a massa celular de cada mutante foi coletada e, utilizando água bi-destilada, a concentração celular foi padronizada em 10^8 UFC/mL, equivalente a uma densidade óptica de 0,3 a 600nm (OD600_{nm}). A inoculação na porção abaxial de folhas jovens da planta foi realizada pelo método da infiltração por seringa sem agulha (Laia et al., 2009), que possibilita a entrada do inóculo pelos estômatos. Na mesma folha, do lado direito da nervura central foi inoculada a estirpe selvagem e do lado esquerdo foi inoculada a bactéria mutante. As plantas permaneceram no laboratório de segurança, ou seja, uma sala climatizada (28°C), com fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro) e umidade (70-80%) controlados, com antecâmara e pressão negativa. A avaliação do desenvolvimento dos sintomas da canrose em plantas hospedeiras ocorreu a partir do terceiro dia após inoculação (DAI) até o 24º dia. Os mutantes que apresentaram diferenças nos sintomas de canrose ou nos níveis de virulência da estirpe selvagem foram selecionados e reinoculados três vezes para a confirmação dos resultados. Durante todo o período de avaliação dos sintomas os mesmos foram registrados por fotografias.

4.4 Identificação dos genes mutados

4.4.1 Extração e quantificação de DNA genômico total de mutantes de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii*

Os mutantes selecionados após o “screening” da biblioteca foram multiplicados em tubos do tipo Falcon com capacidade de 50 mL, contendo 6 mL de meio NA líquido acrescido de canamicina (50 µg/mL), durante 16 horas a 29°C, com agitação constante de 200 rpm. Em seguida, a extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega), conforme o protocolo do fabricante. A mensuração da concentração de DNA contido em cada amostra foi realizada através do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

4.4.2 PCR inversa

Visando a identificação de cada gene mutado, utilizou-se a estratégia da PCR inversa (Ochman et al, 1988). Uma amostra do DNA genômico total (5 µg) foi digerido pela enzima *EcoRI*, como recomendado pelo fabricante (Thermo Scientific) e, posteriormente, houve a inativação térmica da enzima e purificação das amostras utilizando o kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, 1µg dos fragmentos de DNA passaram pela reação de ligação através da adição de 5U da enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific) e a reação prosseguiu por 3 horas a 22°C. Após a inativação térmica da enzima, as amostras de DNA circularizados foram transferidas para microtubos de capacidade de 1,5 mL e precipitadas pela adição de 1/10 do volume de 3 M acetato de sódio pH 5,2 e 1 volume de isopropanol e incubação a -20°C por 16 horas.

O DNA foi então precipitado por centrifugação a 22.285 x g a 4°C em uma microcentrífuga (Eppendorf) e a fase aquosa foi removida. O precipitado de DNA foi lavado com 1,0 mL de etanol 70% e centrifugado novamente a 22.285 x g a 20°C, com a fase aquosa sendo novamente descartada. O precipitado de DNA foi seco à

temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspendido em 15 µL de água estéril a 4°C por 2 horas e aquecido a 50°C por 10 minutos.

A PCR foi realizada em reações contendo 3 µg de DNA circularizado, 10 µM de cada um dos oligonucleotídeos KAN-2 FP-1 (5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3') e KAN-2 RP-1 (5'-GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG-3'), 2,5mM de dNTPs e 5U de Taq DNA polimerase (Thermo Scientific). As amostras passaram por uma desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 98°C por 10 segundos, 65,9°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, seguidos da extensão final a 72°C durante 10 minutos.

O DNA advindo da reação de PCR foi separado através do processo de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, e as bandas foram cortadas do gel e purificadas utilizando o kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-up System" (Promega). Após a purificação, as amostras de DNA provenientes da PCR inversa foram submetidas a reação de sequenciamento no sequenciador ABI 3730xl (Applied Biosystems) utilizando o "BigDye v3.1 kit" (Applied Biosystems). Foram realizadas duas reações de sequenciamento, uma para cada extremidade do DNA que flanqueia o transposon, empregando os oligonucleotídeos KAN-2 FP-1 e KAN-2 RP-1 (Epicentre Technologies). As sequências resultantes foram analisadas pelo programa "Codon Code Aligner" e a identificação das sequências foi realizada através dos algoritmos BLASTn e BLASTx.

4.5 Análise da expressão gênica do mutante Δ XAUC_36880

4.5.1 Extração de RNA total de XauC em estágio infectante

A extração de RNA total da bactéria selvagem XauC ICPB 10535 e do mutante Δ XAUC_36880 ocorreu por meio do kit "RNeasy Protect Bacteria Mini" (Qiagen) utilizando "pellets" bacterianos exsudados de folhas de *C. aurantifolia* cinco dias após inoculação, seguindo as orientações do fabricante. A qualidade do RNA total extraído foi analisada pelo "NanoDrop 1000 Spectrophotometer" (Thermo Fisher Scientific) e a concentração foi mensurada através do fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) utilizando o kit "Qubit® RNA HS Assay" (Invitrogen).

4.5.2 Síntese de cDNA e RT- PCR

Para sintetizar a primeira fita de cDNA foram utilizados 84,8 e 200 ng de RNA total extraído de XauC 10535 selvagem e do mutante $\Delta XAUC_36880$ em condição infectante e o kit “SuperScript III First Strand Synthesis Super Mix for qRT-PCR” (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante.

Essas amostras de cDNA foram utilizadas posteriormente para obtenção dos *amplicons* correspondentes aos genes, adjacentes a região intergênica onde ocorreu a mutação, que codificam a RNA pirofosfolidase, proteína ribossomal S9, e os RNAs transportadores tRNA-Gln e tRNA-Met com os respectivos “primers” descritos na Tabela 1, utilizando enzimas de alta fidelidade.

Tabela 1: “Primers” utilizados para amplificação individual dos genes e os RNAs transportadores *tRNA-Gln* e *tRNA-Met*, respectivamente.

Nome dos “primers”	Sequência 5' → 3'	“Amplicon” (pb)
RNAPyro_F	ATGCGGCAGGACGGTCAGG	573
RNAPyro_R	TTAATCATTATTAATCCGCATCGC	
F1_36880	ATGGCTATCACGCAAACTAC	393
R1_36880	TCAGCGCTTGGAGAACTGG	
F_tRNA-Gln	TGCCCCGTCGCCAAGCGGT	74
R1_tRNA-Gln	GGCTGCCCCGGATGGATTC	
F_tRNA-Met	GGCTATGTAGCTCAGCCGG	76
R1_tRNA-Met	GGTGGCTATGGGTGGACTC	

As amostras de cDNA, juntamente com os “primers” RNAPyro_F e RNAPyro_R, passaram por uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 95°C por um minuto, 60°C por um minuto e 72°C por um minuto, seguidos da extensão final a 72°C durante oito minutos.

A amplificação dos fragmentos correspondentes a proteína ribossomal S9 e aos RNAs transportadores – tRNA(Gln) , tRNA(Met) – ocorreu através de uma desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos de amplificação a 98°C por 10 segundos, anelamento por 10 segundos utilizando a temperatura ideal

para cada par de “primers” (65,8°C, 72°C e 69,5°C, respectivamente) e 72°C por dois minutos, seguidos pela extensão final a qual ocorreu na temperatura de 72°C durante 10 minutos.

O processo de eletroforese ocorreu em gel de agarose a 0,8% com tampão TBE (Tris-Borate-EDTA) 0,5X (TBE 5X: 54 g/L de Tris base, 27,5 g/L de ácido bórico, 20 mL de EDTA a 0,5 M, pH 8,0, q.s.p 1 L água MiliQ), corado com brometo de etídeo (10 mg/mL). Os produtos esperados da amplificação do RNA pirofosfotransferase e da proteína ribossomal S9, juntamente com os tRNA(Gln) e tRNA(Met), eram fragmentos com 573, 393, 74 e 76 pares de base respectivamente, e foram visualizados através de exposição do gel à luz ultravioleta e fotodocumentação utilizando o aparelho fotodocumentador “Molecular Imager Gel DocTM XR+ Imaging System” (BIORAD).

4.6 Curva de crescimento bacteriano *in planta*

A curva de crescimento *in planta* foi realizada segundo Laia (2009), com modificações descritas a seguir. O cultivo e os inóculos dos mutantes e de XauC selvagem foram realizados como descrito acima e, após o crescimento, uma massa de células bacterianas foi adicionada em tubos do tipo Falcon de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultura líquido NBY (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona, 2 g de extrato de levedura, 2 g de K₂HPO₄, 0,5 g de KH₂PO₄, e água destilada q.s.p. 1000 mL) e estes foram incubados a 29°C sob agitação constante de 180 rpm por aproximadamente 16 horas. A DO_{600nm} dos inóculos foi ajustada para 0,3 e estes foram centrifugados a 4.000g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de bactérias foi ressuspensionado em PBS 1X (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na₂HPO₄, 0,24 g/L de KH₂PO₄, pH 7,3). Aproximadamente 20 folhas jovens de cada uma de três plantas de *Citrus aurantifolia* foram inoculadas em quatro pontos utilizando-se a técnica de infiltração. As plantas foram mantidas em laboratório de segurança, em condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade. O número de células por área foi quantificado através da coleta de quatro discos de 1 cm³ de diâmetro de cada planta, coletados a partir dos pontos em 6 tempos diferentes: 0, 1, 3, 10, 15 e 20 dias após inoculação (DAI). Os discos

foliares foram macerados em 1 mL de PBS 1X com auxílio de um pistilo e 10µL de cada amostra e suas respectivas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) foram pipetadas em placas contendo meio NA sólido, utilizando o método da microgota. Após 72 horas de incubação a 29°C as colônias oriundas de cada microgota foram contabilizadas.

4.7 Curva de crescimento bacteriano *in vitro* em meio de cultura NBY e em meio de cultura XVM2 para os mutantes $\Delta XAUC_30580$ e $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$)

Os inóculos foram preparados como descrito no item 3.1. Após o crescimento, três colônias isoladas (réplicas biológicas) foram transferidas para placas contendo NA e mantidas nas mesmas condições anteriores e, após 96 horas, uma alçada de massa celular de cada mutante foi transferida para tubo Erlenmeyers de 125 mL contendo 15 mL de meio de cultura líquido NBY ou XVM2 (20 mM de NaCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 5 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 0,16 mM KH_2PO_4 , 0,32 mM K_2HPO_4 , 0,01 mM $FeSO_4$, 10 mM frutose, 10 mM sacarose e 0,03% de casaminoácidos, pH 6,7) e as amostras foram mantidas a 29°C por aproximadamente 16 horas, a 180 rpm. Posteriormente, as amostras foram ajustadas para uma concentração de 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} igual a 0,3) por meio da adição de meio de cultura líquido NBY ou XVM2 frescos. Após a diluição, 5 mL de cada suspensão bacteriana foram inoculados em três Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido NBY ou XVM2 (triplicatas técnicas) e mantidos a 29°C e 180 rpm, com alíquotas sendo retiradas nos tempos de: 0, 3, 5, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32 e 36 Horas Após a Inoculação (HAI). Em cada tempo, foram coletados 200 µL de cada amostra e foram realizadas três leituras da DO_{600nm} para cada réplica técnica dos pré-inóculos.

4.8 Teste de auto agregação de XauC selvagem e mutante

Os isolados bacterianos XauC selvagem e os mutantes cresceram conforme já descrito (vide Curva de crescimento bacteriano *in vitro*) e, ao atingirem a DO_{600nm} equivalente a 2,0, amostras de 10 mL de cada cultura (triplicatas biológicas advindas de três colônias isoladas) foram transferidas para três tubos de ensaio tipo

borosilicato estéreis de 20 mL (triplicatas técnicas). As culturas foram agitadas vigorosamente por 15 segundos e os tubos permaneceram estáticos durante 24 horas, quando uma amostra de 100 µL foi retirada na altura de 1 cm do topo da cultura e adicionada a 900 µL de meio de cultura NBY (diluição de 10 vezes). A densidade óptica foi avaliada a 600nm e multiplicada por 10. Os tubos permaneceram estáticos durante as 24 horas em que o experimento ocorreu.

4.9 Testes da motilidade “Twitching” do mutante $\Delta XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$)

O teste de motilidade “Twitching” foi realizado como descrito por Dunger et al. (2014), com modificações descritas a seguir. O mutante $\Delta XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$) e a bactéria selvagem foram plaqueadas em meio NA e incubadas a 29°C por 96 horas. Após o crescimento, uma colônia isolada foi coletada com um palito estéril e foi inoculada em placa de Petri contendo ágar SB 1% (ágar 10 g/L, sacarose 5 g/L, extrato de levedura 5g/L, peptona 5g/L, L-ácido glutâmico 1g/L, pH 7,0), pelo método de punção, permanecendo incubada a 29°C por oito dias. Posteriormente, a fina camada de meio de cultura foi removida cuidadosamente e a superfície da placa foi corada com Cristal violeta 0,1% por 15 minutos. O corante não fixado foi removido por enxague com água destilada estéril e as placas foram fotografadas através de um foto-documentador. O teste de motilidade foi realizado em triplicatas biológicas e técnicas.

4.10 Produção de Biofilme em meio de cultura NBY e em XVM2 para os mutantes $\Delta XAUC_{30580}$ e $\Delta XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$)

Os ensaios de biofilme foram realizados para os mutantes e XauC selvagem, com modificações descritas a seguir. A DO_{600nm} dos inóculos em NBY (Yan, Hu e Wang 2012) e XVM2 suplementado com 1% de glicose (Rigano et al., 2007) foi ajustada para 0,3 (10^8 UFC/mL) independentemente e, então, 1 mL dessas suspensões foi transferido para tubos de ensaio de borosilicato estéreis com capacidade para 20 mL, os quais permaneceram mantidos sem agitação em câmara umidificada por 72 horas a 29°C.

As culturas foram descartadas e os tubos lavados duas vezes com água de torneira. O biofilme formado nos tubos foi visualizado através de coloração com violeta genciana a 0,1% por 30 minutos e as células fixadas com o corante foram dissolvidas em 1mL de DMSO por agitação a 300 rpm durante 16 horas e foram quantificadas pela medição da OD595_{nm} com a utilização do leitor de microplacas “iMark”TM (“Bio-Rad Laboratories”, Inc., EUA). As medições quantitativas representam as médias obtidas de quatro repetições técnicas provenientes de quatro colônias independentes (repetições biológicas).

4.11 Formação de goma xantana

A quantificação de goma xantana produzida foi realizada como descrito por Moreira et al. (2010), com adaptações descritas a seguir. O preparo dos inóculos bacterianos ocorreu em 10 mL de meio de cultura NBY, semelhantemente aos outros inóculos realizados. Após o ajuste das suspensões bacterianas para a concentração de 10⁸ UFC/mL, 2,5 mL de cada inóculo foram transferidos para 100mL de meio de cultura próprio para a estimulação da síntese de goma xantana (25 g/L de glicose, 3 g/L de extrato de levedura, 2 g/L de K₂HPO₄, 0,1 g/L de MgSO₄ x 7H₂O, pH 7,0) (Souw; Demain, 1979) em Erlenmeyers com a capacidade para 250mL. Os inóculos permaneceram incubados a 29°C, a 180rpm, por 96 horas.

A extração da goma foi realizada da seguinte forma: os inóculos contendo 100 mL de cultura bacteriana foram centrifugados a 10.000g, a 4°C, por 40 minutos e, em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para béqueres com a capacidade de 500 mL, e foram adicionados 4 g de KCl. Os sobrenadantes permaneceram em agitação durante 15 minutos em um agitador magnético. Após a completa dissolução do KCl, houve a adição de 200 mL de isopropanol gelado e, com o auxílio de um bastão de vidro, a solução foi agitada até a formação da goma, a qual foi extraída e transferida para copos plásticos de 50 mL, os quais permaneceram incubados em estufa a 37°C por 72 horas. Os *pellets* resultantes da centrifugação foram ressuspensos em 1,0 mL de água ultrapura estéril, e foram transferidos para béqueres de 80 mL, sendo estes armazenados em estufa a 70°C durante 24 horas. Após secagem das amostras, estas foram pesadas para mensurar o peso seco das

células e da goma xantana produzidas. Para cada mutante e selvagem foram feitas quatro réplicas técnicas.

4.12 Análise estatística

Os dados resultantes dos experimentos de auto-agregação, motilidade e produção de biofilme foram analisados pelo teste de comparação de médias Tukey a 5% ou a 1% de probabilidade, via o programa SigmaPlot 12.0.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da patogenicidade de XauC *in planta*

Visando determinar se a inserção do transposon no genoma bacteriano afetou a patogenicidade e virulência de XauC, 576 mutantes foram inoculados de maneira individual em folhas de lima ácida 'Galego' (*Citrus aurantifolia*). Destes, três apresentaram modificações nos sintomas da cancriose. O mutante $\Delta XAUC_30580$ apresentou redução no sintoma de encharcamento enquanto os outros dois mutantes, $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$) e $\Delta XAUC_36880$, demonstraram redução dos sintomas da cancriose, como, necrose e encharcamento, quando comparados a XauC selvagem conforme observado nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente.

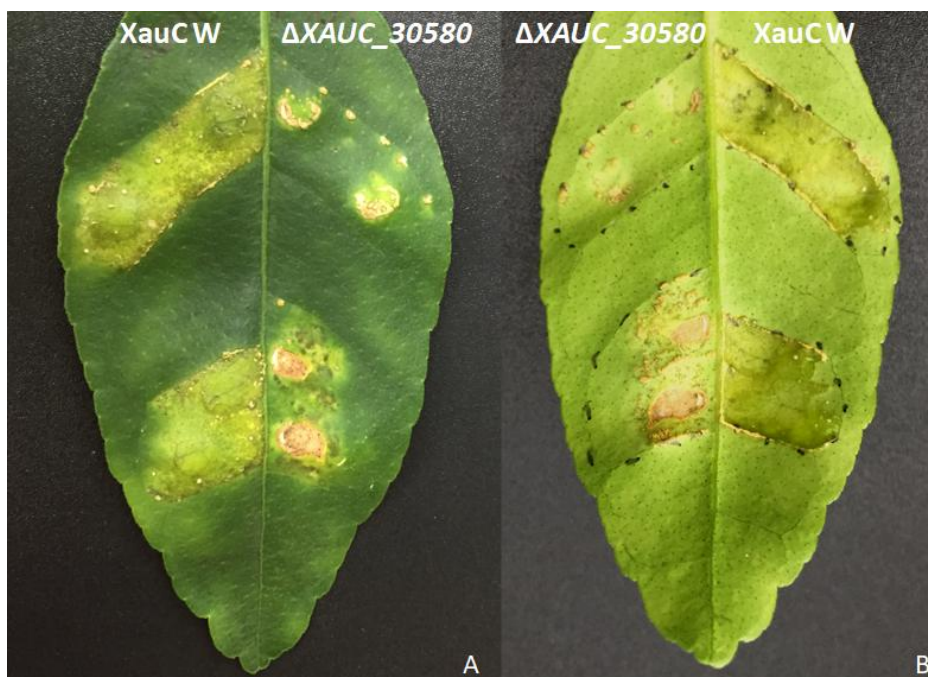


Figura 1 - Teste de patogenicidade do mutante $\Delta XAUC_{30580}$ e da estirpe selvagem (XauC W) inoculados na concentração de 10^8 UFC/mL em folhas de *C. aurantifolia*. A foto documentação ocorreu 24 dias após a inoculação (DAI). (A) superfície adaxial da folha; (B) superfície abaxial da folha.



Figura 2 - Teste de patogenicidade do mutante $\Delta PilY1$ e da estirpe selvagem (XauC W) inoculados na concentração de 10^8 UFC/mL em folhas de *C. aurantifolia*. A fotodocumentação ocorreu 24 dias após a inoculação (DAI). (A) superfície adaxial da folha; (B) superfície abaxial da folha.



Figura 3 - Teste de patogenicidade do mutante $\Delta XAUC_36880$ e da estirpe selvagem (XauC W) inoculados na concentração de 10^8 UFC/mL em folhas de *C. aurantifolia*. A fotodocumentação ocorreu 24 dias após a inoculação (DAI). (A) superfície adaxial da folha; (B) superfície abaxial da folha.

5.2 Identificação das regiões genômicas mutadas

A região de inserção do transposon em cada mutante foi identificada através de amplificação por PCR inversa e sequenciamento.

5.3 PCR inversa

A extração de DNA de ambos os mutantes resultou na concentração de 2744, 1486 e 1500 ng/ μ L para os mutantes $\Delta XAUC_30580$, $\Delta XAUC_36880$ e $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$), respectivamente. A digestão, precipitação e purificação dos DNAs dos mutantes $\Delta XAUC_30580$, $\Delta XAUC_36880$ (Figura 4, A) e $\Delta XAUC_12280$ (Figura 4, B) resultou em um padrão de digestão e concentrações de DNA satisfatórios, como pode ser verificado na Tabela 2.

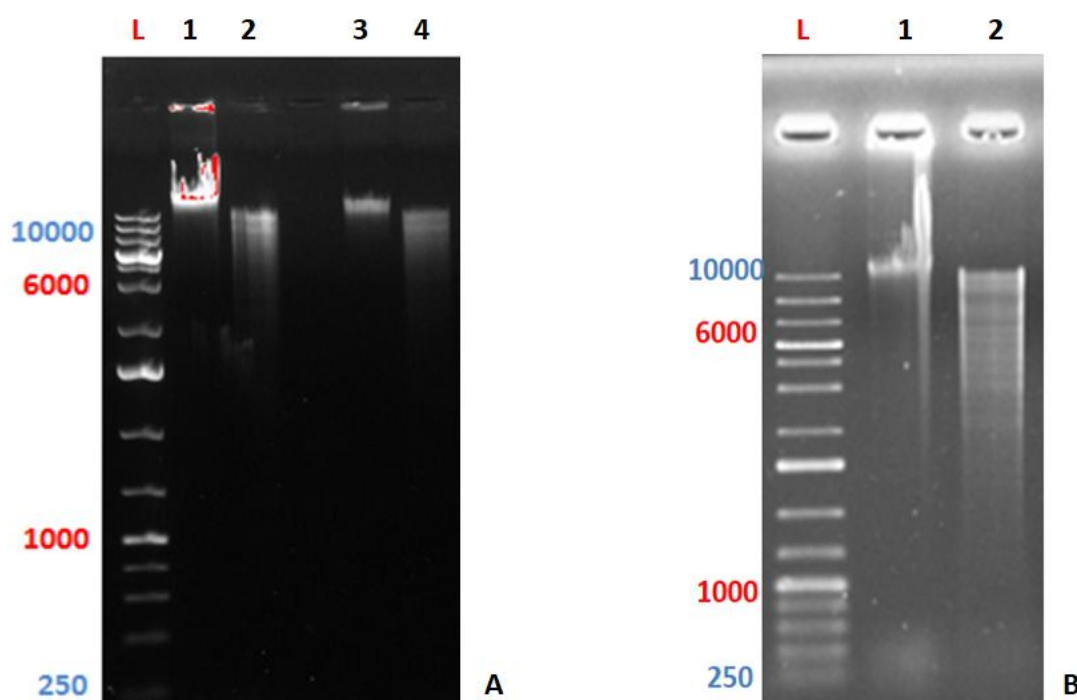


Figura 4- **A)** Resultado da digestão do DNA total dos mutantes $\Delta XAUC_{36880}$ e $\Delta XAUC_{30580}$ com a enzimas de restrição *EcoRI*. **1-** Mutante $\Delta XAUC_{36880}$ íntegro. **2-** Mutante $\Delta XAUC_{36880}$ digerido com *EcoRI* (Thermo); **3-** Mutante $\Delta XAUC_{30580}$ íntegro. **4-** Mutante $\Delta XAUC_{30580}$ digerido com *EcoRI* (Thermo). **B)** Resultado da digestão do DNA total do mutante $\Delta XAUC_{12280}$ com a enzima de restrição *EcoRI*. **1-** Mutante $\Delta XAUC_{12280}$ íntegro. **2-** Mutante $\Delta XAUC_{12280}$ digerido com *EcoRI* (Thermo); **L-** marcadores de peso molecular *Gene Ruler* 1Kb (Fermentas). A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% a 0,4 V/cm.

Tabela 2: Análise das amostras de DNA: verificação da qualidade e estimativa de concentração do DNA digerido e purificado dos mutantes $\Delta XAUC_{30580}$, $\Delta XAUC_{36880}$ e $\Delta XAUC_{12280}$.

Mutante	Razão A260/A280nm	Razão A260/A230nm	Concentração (ng/μl)
$\Delta XAUC_{30580}$	1,92	1,64	117,7
$\Delta XAUC_{36880}$	1,91	1,86	175,6
$\Delta XAUC_{12280}$	1,96	1,92	61,7

A PCR para a amplificação da região mutada antes do sequenciamento resultou na amplificação de uma banda forte para o mutante $\Delta XAUC_{36880}$ e de uma banda única para os mutantes $\Delta XAUC_{30580}$ e $\Delta XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$). O

registro fotográfico destes resultados (resultados não apresentados) foi feito após o corte das bandas para posterior purificação, para evitar a quebra e perda destes DNAs, uma vez que foi utilizada, para a eletroforese, uma malha de agarose (0,8%) do tipo “low melting”.

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA purificado da etapa anterior pode ser vista na Tabela 3. Os fragmentos foram então submetidos ao sequenciamento para identificação da região de inserção do transposon.

Tabela 3: Análise das amostras de DNA: verificação da qualidade e estimativa de concentração das amplificações para o sequenciamento dos mutantes $\Delta XAUC_30580$, $\Delta XAUC_36880$ e $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PiIY1$)

Mutante	Razão	Razão	Concentração (ng/ μ l)
	A260/A280nm	260/230nm	
$\Delta XAUC_30580$	0,23	1,61	17,2
$\Delta XAUC_36880$	0,54	1,49	14,3
$\Delta XAUC_12280$	1,99	0,85	16,8

5.3.1 Análise *in silico* das regiões mutadas

No caso do mutante $\Delta XAUC_30580$, a sequência gerada pelo sequenciamento da banda obtida na PCR inversa, quando submetida à análise pelo programa BLAST revelou tratar-se do gene $XAUC_30580$, o qual codifica a proteína Fumarilacetoacetato hidrolase- FAH. O gene foi interrompido entre as bases 227 e 228 (Figura 5), ou seja, entre a segunda e a terceira base do códon CCA que codifica a prolina 76 da proteína (Figura 6).

```

>CP021018.1:303073-303786 Xanthomonas citri var. fuscans strain
CFBP6167, complete genome
ATGACCCACGATGTGATTCCCGCCGCCGATGTTCCGCGCATTCCAGTGGTGGGCGGTGGCAGTTTTCCGG
TGCACCGCATCTACTGCGTAGGGCGCAACTTCGCCGACCATGCGCGCGAGATGGGCGCCACCGCACCGGC
CTCCAAGGACGAGCGTGGCCAGCCGACTTTTTTCATGAAGCCTGCCGATGCCATCGTGGTGGGCCACGGC
GACCACATCCCCTACCC▼ACCCGGCACCAGGGAATGCACCATGAAGTGGAACTGGTGGTGGCGCTGGGC
AGCGATGCGCCCGCTGGCGAGTTGCCGGTGGAACAGGCCGAGCGCTTGATCTACGGCTACGGCGTGGGCC
TGGATCTGACCCGTCGCGATCTGCAGGCCGCTGCCAAGGCAAAAGGCTTGCCCTGGGATATCGCAAAGGG
CTTCGATCACTCCGCGCCGGTGAGCGAGCTGGTGCATGCCGGCGAAGTCGGCGCGCTGGAGGCGCTGAAT
CTGTCGCTGGAGGTCAACGGCCAGGTGCGTCAGCAGTCATTGCTGGATCAAATGATCTGGAACGTGCCGG
AGATCCTGCACGAGCTTTCCAAACTGTATGCACTGCGCGCAGGTGATCTGATTTTCATGGGCACGCCGGC
CGGCGTCGGCCCGTTGCTGCCAGGCGACCAAGTTCAGTGCGCGCCTGGAGAACGTCGCCGAGCGCCACGGC
ATCATCGCGGGCTGA

```

Figura 5 - Sequência nucleotídica do gene que codifica uma proteína da superfamília fumarilacetoacetato hidrolase, e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu entre as bases 227 e 228, indicada pelo triângulo vermelho, entre a segunda e a terceira base do códon CCA da prolina.

```

>gi|292603172|gb|EFF46597.1| fumarylacetoacetate hydrolase family
protein [Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii str. ICPB 10535]
MTHDVIPAADVPRIIPVVGGSFVPHRIYCVGRNFADHAREMGATAPASKDERGQPTFFMKPADAIVVGHG
DHIPY▼PGTRELHHEVELVVALGSDAPAGELPVEQAERLIYGYGVGLDLTRRDLQAAAKAKGLPWDIAK
GFDHSAPVSELVHAGEVGALEALNLSLEVNGQVRQSLDQMIWNVPEILHELKLYALRAGDLIFMGTP
AGVGPPLLPGDQFSARLENVAERHGIIAG

```

Figura 6 - Sequência de aminoácidos da proteína fumarilacetoacetato hidrolase, e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu no aminoácido 76, uma Prolina (P), como pode ser observado pelo triângulo vermelho.

Análises pelo programa *Kegg Pathway* demonstraram que o gene homólogo ao *XAUC_30580*, *XAC3609*, está presente na via do metabolismo da tirosina, como pode ser verificado na Figura 7.

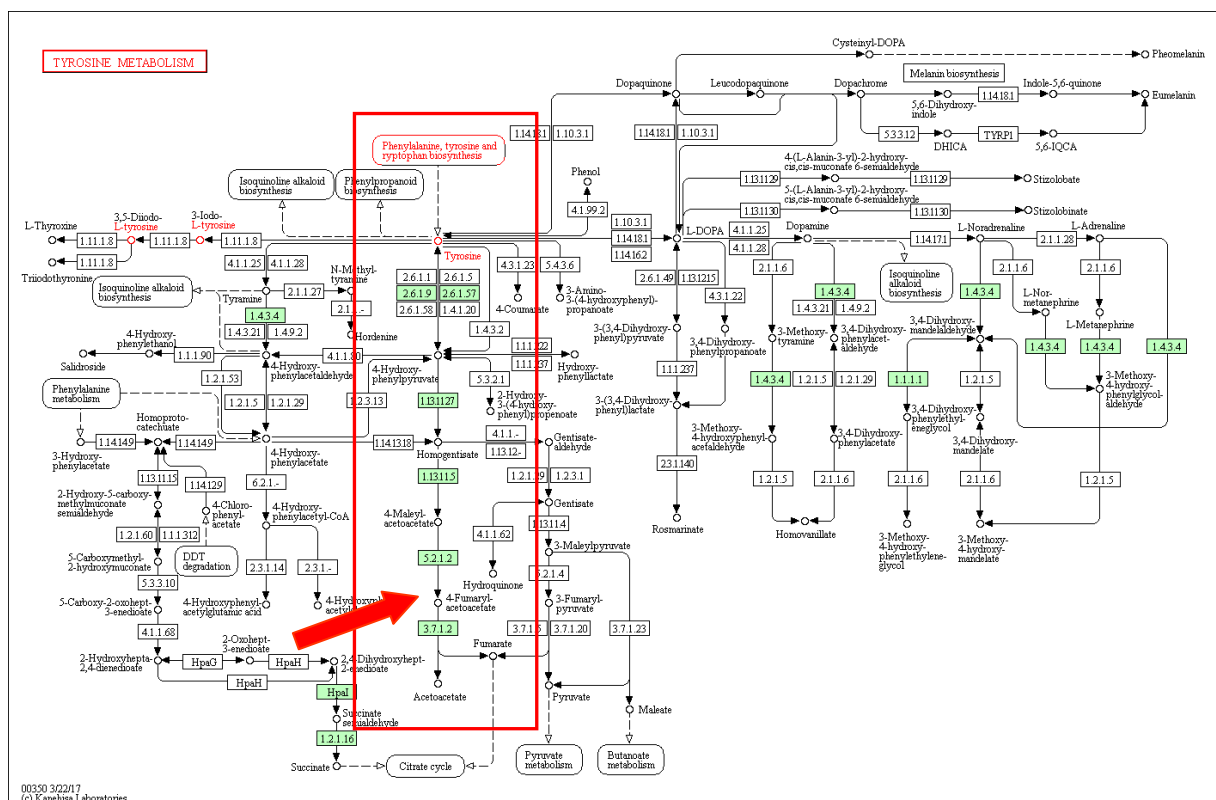


Figura 7- Metabolismo da tirosina da espécie *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Em destaque, verificamos a via de biossíntese de tirosina e, indicado pela seta, o gene XAC3609 (*uptA*), o qual teve seu gene homólogo em XauC mutado.

No mutante $\Delta XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$) o transposon se inseriu entre as bases 2.466 e 2.467 do gene *XAUC_{12280}* (*PilY1*) (Figura 8), entre os aminoácidos 822 (arginina-R) e 823 (tirosina-Y) da proteína codificada pelo gene *XAUC_{12280}* ($\Delta PilY1$) (Figura 9). Trata-se da proteína adesina do *pili* tipo IV, a qual é responsável pela motilidade bacteriana através da contração do próprio *pili*.

>ACPY01000161.1:21790-25536 *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* str.
 ICPB 10535 xauc_ctg1163_0, whole genome shotgun sequence
 ATGACAGCTCACAGAAAAAAGTGGTCTTGGCTTCGGCACTGACGGGTGCGGTGGGGTGGGGTTCCTCA
 TCTACACCTTGATTGCTGCGCAGGGACAGGGCGTACTGGCTCAGGCGCGGATGAACGACAGGTGCAGAC
 GCCTCCCGCGTTTCATCATGGCGGTGGATGACTCGGGCTCGATGACATTCAGACTCAGTTTCGGGGACAG
 GATGGTCAGGGATGCTGGAGCAGCGCTAGGCAAAGCTTCTTTCTGCTCAAGGCACATTGAACACCGAGG
 ATTCCGCCAAGCGTGGGGTGTGGTTACAAACCATGTCCTGCCGCGGTTCGTATCGACGAAAACCGTCGCGG
 CATCCCAACCCCTGGACAGCCTTGGGTTTGC GCGCTCTGCTGCCTACAACCCACCTATTACGATCCAGTG
 GTCAAATACGACCCGTGGATAAAATAACGATGGGAATCCTTTCCTCAGGCGGATTTGGTCAATACGCGGA
 TCAACCCGCTCCAGGCAAGGTGCCACTGTGGCGCTTGTCTTCCAACCTATATGGGGGATGATTTAGCAGCAG
 TTTTCAGAAATTCAGAACGGAATGGTGCCTCCTCGCGGTACGGGATACAAGCAGCGTTTCAGGATAACAAAT
 GGCAGTCTCTACTTCGGAATGAACAGGTAAACGACTTCCGACGTAACCTGGAATGGTGGTTCGCAGACGC
 TGCTGATCAGGTTCTGGCCGGCGACCTTTCTTGTGCTTATACAAGCGACACGGACGCCAGCGCGCTTCT
 CGCTGGCGCTGCCGCTTACGATGCGGTGACGCGTGATCGGGTGCCTAATGTATGTGGTACCGGCTGCGAT
 ATGTGGAAGTATACAATAAAAGCCACAAATACTGATGCCCTTCAGAACTTTGCAAATTTGGTTTTCATTCT
 ATGGAAATCGAAATCGAGCCATCATTGCTGGCATGACAGGTTCATTGGCTAACGTCAATAATATGCGGGT
 TGGTTTTTTCAGGATCAACCAAACGCAAGTTATGACTCGGTCAATGAAAACTGCCCATGCGCAATATG
 GGTACGCAAGCGAGAAGACCGCCCTGTATAATTCGATTCTAGCCCTGCCCGCTAGTGGTGGTACGCCGA
 ATCGGCAGGCGGTCAACGCGGCTGGTATCCAGTTTCAGCGGACTGATAGTGCAGCTCCTGTCCAGCTGGC
 ATGCCAAAAAATGCGGTTCATGCTGTTTACGGATGGATACAGCAATCAGGATGGCCCATCCGTAAGTAAC
 GCGAGCGGCGACGGGAATATGGGATTCCTTTTGC GACGCGTACGACAAACCATGGCGCATTTGCTG
 CCAAGTATTATAATAATATCAACGGCGGCTCTCCCATTCGAGCGGATATGCCATCTGGCCTGGTGGCCGT
 TCCAAGCTCATGCAACACCGCTAATGCGAGTGTGAGGCTGGATTGTGAGAAGAACCTGCACGTTAACTTC
 TATGGCATCACGCTGGGTGCGCGCGGTGATCTTTCAATCCAAATGTTGTGAGGACCGGTACACGACAC
 CGGCATTATCAAACTGGCGCGCGGTGAGAACGATGAGCGAAGCACTGTGACGATATCTGCGCATGC
 GGCTACGAATACGCGCGGCAATACATCAATGCCCGGACCCGGCTGAATCACTCAAGCAATGCGACGT
 TGTGCTTCGTGCGGTGACGGCGGGCTCTTCGCTTCAGGGACGCTGGCTCAGAGTGGTGCCCGTATCGGCG
 TAGGATCCTTCTCGGTTGCCCGCAACTATGAAATTGCAAAATGAGGGCACTGACTGGTTTGGCGCGCTCAC
 CGGGTACACTGTATCGGTCAACCCGCGACACCGCGTGGCGGTGAGCACTGCTGCATGGGAAGCCAGCGCG
 CGCATGCGCTTCGCTGCGGCTCGTAATGTGTTGGTGGAGCAAGCGGGGTGGTTTCGGCGCTCAACGAGA
 CGAATATCTCTTGTGCGATCTGTGCACCAAGTGCAGTGCCTCTACCGGGCATGTCTTGTGTACTGC
 TTTGGATCTTGCAACTCTTGGGGCGAATGCAGCGACGCGCATATCTGCGCGGGGACGCGCTGGA
 GAGGTGCGAAGCGGAGGTGCTTGGCTGACGCAACGACGCTTCGGGCGACATCTGCAACTCGACTCCCG
 TGATCAGTTCTCCACTGGATGATTATGGTTACGGCAGCCTGCCAGGCAACCCGGGGCTACTTACAGAC
 CTATTTGAATACGAAAAAGGCCAGTCTGAATATATGCTATGTGGGGCCAAATGATGGAATGTGCAC
 GGTTCGACGGCGGTATGAATGGTGTGTCGCTTATGGCTCCAACGGCGGGGTGAGCGTTTTGCATATA
 TTCCGTGACCGCACTGGGCCATATGGGCAATCTGCTCTTGCCTATGACCCGGCCAAATCAAGCGATCA
 GAAATTCGGTCACCGC^ΔTACTATGTCGATGGGCCCTTGGCCGTCTCGACAGTACTACGGCGGCGCATG
 GAAACCAAGCCTAGTTCGGCACTGCTGGCGCGGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
 ACCAGTGTGACGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
 GCGGCAATATCGGATTTGCTGCTGCGCAAGCGATCATCGTGCCTGATCTTGAATTCGAATGGCAGGTCAG
 CTGGAAGGCGGCTCTTCGGCAATGGCTACAAACAGCGCTAGCGGGGAAAGCGGCTCCTGTTTCTGTAGATATC
 AAGACAGGTACGCGGACCGTAACGATGATCGAAGCTGCGAGAGCGGCGAGTACTGTCTCCGGTAGCAACG
 GTTTGGGCAATATCGTGGTTGTGGATCGTGGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCG
 CGCAGATACTGTCTATGCTGCCGATCAAAAGGGAGCTATTGGAATTCGATTTCGCGCAACACCGACT
 GCGCTGACGGTCCGCTGTTCCAGTGCACGCTCTGTGGAGAATGGCGGACATACCGGCGGCGGATCA
 CGGGTGGCTTGGTGGCCAGTGGCGGTGAAATGGTGGTGTGACGTGTTCTTCCGTTACTGGCAGCTTCTC
 TTTCCAGAACGACCGTTGATACAGCGATTCAGTCCATCTATGGCATCAACGACGTCGCTGCGGGGAGC
 GTCACAGCACGATTACGCGTTCGAACCTTCAGGCGCACTCGATCGCCACCTCTGGTACATCTCGCAGTC
 TGGTGTAGGGCTCCAGTGTGGCTGGCGGCGAGGGGTGGTATGTGGATCTGCCGCTGGCGAGCGTATGGT
 GGGGAATCTAGTGTGCGCTCGGGGATTGTTTTCATACCCACTTATGTCCCAATCCCAACAGCGTGGGC
 TGTGCATCCAGGGGAGCAATTGGCTGTGTTGGGTTGAACCCGACAGGTGGTGGCGGCTTGGATGTGCG
 CAAGGAACGGCTCTCCCTCCGGCGCAGCTTTTGGCTCCGGGACCGCGGCGACGTCGTTGACACGACGAGG
 GACGACACCCGTGAAAGAGCTGGGTGTTTCAGCGATTCCAGCTTGACTCCTTCCGAGACGGGCGGGTCT
 CTGCCGCGCGGTGGTAGCTCTGCTGGATGGTGATCAATGTGGCTGGCGCGCAGCCGATGTATGTTCTT
 ATCCCTGCGGAAGACAGTCTGGAGGACAGATCCAGTGA

Figura 8 - Sequência nucleotídica do gene *XAUC_12280* ($\Delta PiIY1$), e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu entre as bases 2.466 e 2.467, indicada pelo triângulo vermelho, entre o códon CGC (Arginina) e o códon TCA (Tirosina).

```

>EFF48406.1 Tfp pilus adhesin [Xanthomonas citri pv.
aurantifolii str. ICPB 10535]
MTAHRKKVVLASALTGAVGLGFFIYTLIAAQGGVLAQAPMNDQVQTPPAFIMAVDDSGSMTFT
QFPGQDGGGCWSTARQSFFSAQGTLNTEDESPVGCYNHVLPGVRIDENRRGIPPLDSLGFARS
AAYNPTYYPVVKYDPWINNDGNPFPQADLVNTRINPLQAGATVALASNYMGDDFSSSFRIQNG
MVLPRGTGYKQRFQDNNGSLYFGNEQVTTSDVTWNGGSQTLLIRFWPATFFVPTSDTDARPLL
AGAAAYDAVQRDRVRNVCGTGCDMWKYTIKATNTDALQNFANWFSFYGNRNRAIIAGMTRSLAN
VNNMRVGGFFRINQNASYDSVNEKLPMRNMGTSQSEKTALYNSILALPASGGTPNRQAVNAAGIQF
QRTDSAAPVQLACQKNAVMLFTDGYSNQDGPVSNSASGDGMGIPFADAYDNTMGDIAAKYYNN
INGGSPIRADMPGSLVPVPSSCNTANASVRLDCQKNLHVNFYGITLGARGDLFNPVNVQDAYTT
PAIQNWPPRENDERSTVDDIWAATNTRGQYINARTPAEITQAMRRVLSSVTAGSSPSGTLAQ
SGARIGVGSFSVAPNYEIANEGTDWFGRLTGYTVSVNPQTRVAVSTAWEASARMPSSAAARNVL
VSKAGVVSFAFNETNISLSDLCTKSTALYPGMSLCTALDLATLGANAATATAYLRGDASGEVRSG
GRLRDRITVLGDIVNSTPVISSPLDDYGYGSLPGNPGATYQTYLNTKKASRNYMVVYGANDGML
HGFDGGMNGDGVMASNGGVERFAYIPSTALGHMGNLLLPYDPANQSDQKFGHRAYYVDGPLAVS
DTYYGGAWKTSLVGTAGAGGRSVFAMDVTTPTSVTAASRLWEISDLSSLSAAIRANIGFVLGK
PVIIVPILSSNGTIVTKAVFGNGYNSASGKAVLFLVDIKTGTPVTMIEAESGSTVSGSNGLGN
IVVVDNRWGGTGQTERVRDGYADTVYAADQKGAIWKFDLRNTTALTVPFLTSTSVENGATYRQ
PITGGVLVASAGENGVTLFFGTGSFSFQNDPFDTAIQSIYGINDVAAGSVTSTITRSNLQANSI
ATSGTSRSLVMGSSVAGGQGWYVDLPAGERMVGNPSVASGIVFIPTYVPNPNSVGCASQGSNWL
FGLNTRTGGAALDVARNGSPSGAAAFASGTAATSLTTQGTTPVKDVGVSAPRLTPSETGGSLLP
GGSSCWMVINVAGAQPMYVPYPCGRQSWRIQ

```

Figura 9 - Sequência de aminoácidos do gene *XAUC_12280* ($\Delta Pi/Y1$), e local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu entre uma Arginina (R) e uma Tirosina (Y), como pode ser observado pelo triângulo vermelho.

As análises *in silico* da sequência do mutante $\Delta XAUC_36880$ revelaram que a inserção do transposon ocorreu entre as bases 723 e 724 (Figura 10) em uma região intergênica de 941 pares de bases da fita + do genoma. A região que sofreu interferência do EZ-Tn5 intermeia os genes *XAUC_36870* e *XAUC_36880*. Porém, na fita complementar estão presentes dois tRNAs e o transposon se inseriu entre os dois tRNAs, provavelmente na região promotora do tRNA-Gln (Figura 11).

Xanthomonas citri pv. *aurantifolii* str. ICPB 10535 xauc_ctg1251_0

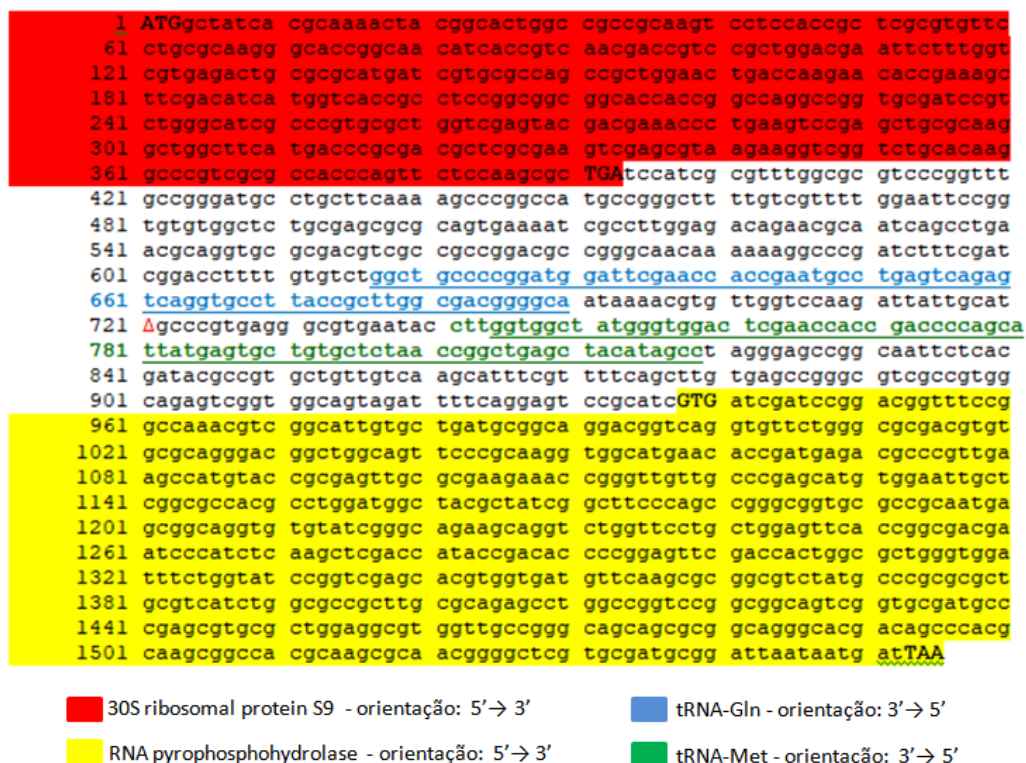


Figura 10 - Sequência nucleotídica da região intergênica situada entre os genes *XAUC_36870* e *XAUC_36880* e, local da inserção do transposon EZ-Tn5. A inserção ocorreu entre as bases 723 e 724, indicada pelo triângulo vermelho.

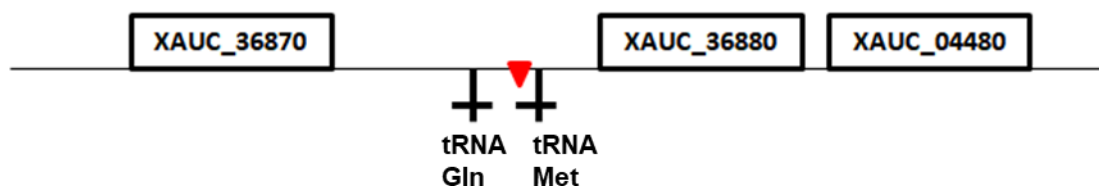


Figura 11 - Localização do transposon inserido na região entre os genes *XAUC_36870* e *XAUC_36880* na fita +, entre o tRNA da glutamina (Gln) à esquerda e o tRNA da metionina (Met) à direita na fita complementar.

5.4 Resultados da RT- PCR

A reação da RT-PCR utilizando os cDNAs de XauC selvagem e do mutante Δ *XAUC_36880*, obtidos em condições infectantes, juntamente com os “primers” RNAPyro_F e RNAPyro_R, resultou na amplificação de um fragmento de 573 pares

de base (Figura 12), correspondente ao gene *RNA pirofosfohidrolase*, indicando que a expressão deste gene à jusante da inserção do transposon não foi alterada.

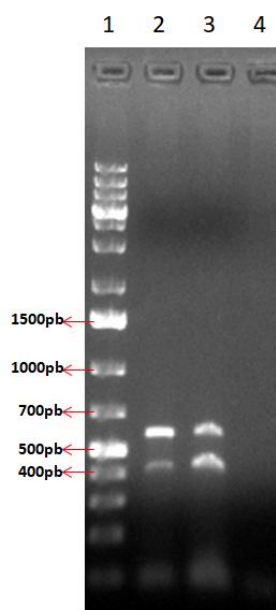


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 0,8% para os produtos resultantes da RT-PCR com os “primers” que amplificam o gene *RNA pirofosfohidrolase* em um fragmento com 573 pares de base (XAUC_36880). **1)** Padrão de peso molecular Gene Ruler 1Kb Plus DNALadder (Fermentas); **2)** fragmento amplificado usando como molde o cDNA da estirpe selvagem XauC; **3)** fragmento amplificado usando como molde o cDNA do mutante Δ XAUC_36880; **4)** controle negativo das amostras.

Como resultado da RT-PCR utilizando os “primers” *F1_36880* e *R1_36880*, *F_tRNA-Gln* e *R1_tRNA-Gln*, *F_tRNA-Met* e *R1_tRNA-Met*, foi possível visualizar fragmentos que continham 393, 74 e 76 pares de bases, correspondendo ao gene *rpsI* e aos RNAs transportadores – tRNA(Gln) , tRNA(Met), demonstrando que a funcionalidade e expressão deles não sofreram alterações com a inserção do transposon na região intergênica (Figura 13).

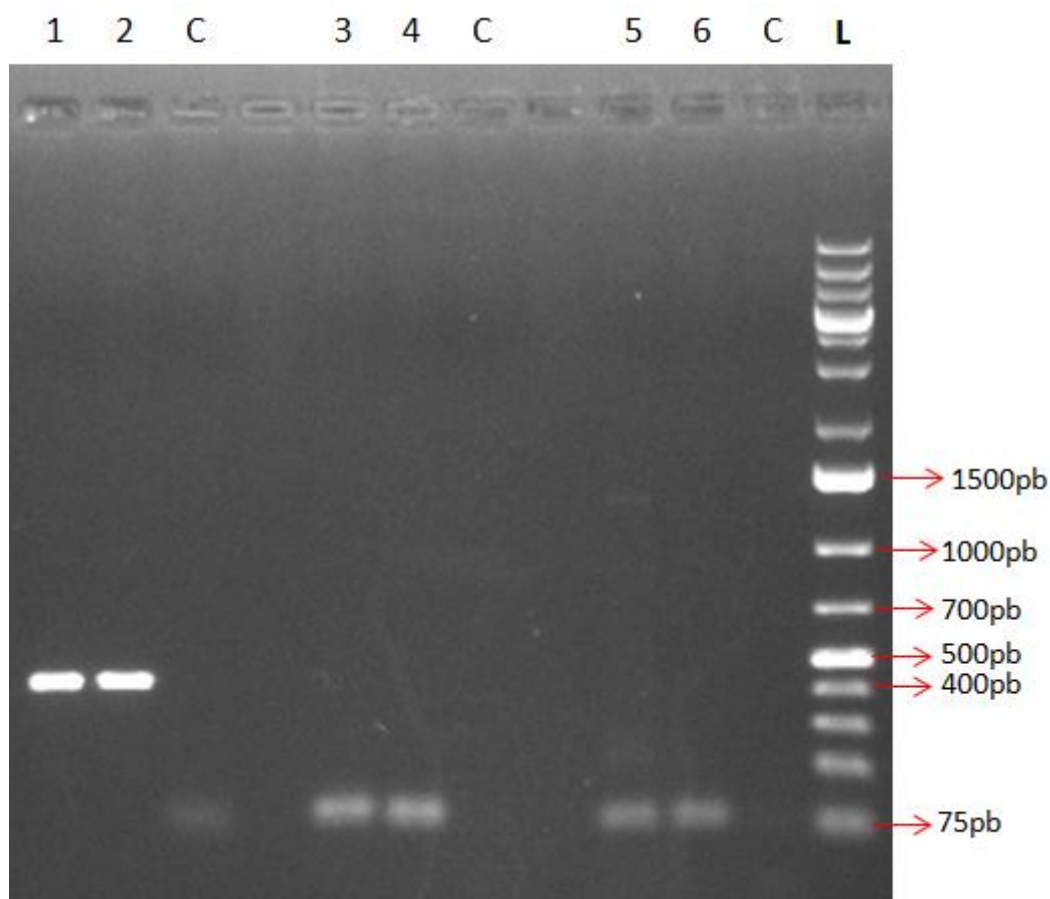


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 0,8% para os produtos resultantes da RT-PCR com os “primers” que amplificam o gene *rpsI* e os RNAs transportadores – tRNA(Gln) e tRNA(Met). **1-2:** Bactéria selvagem e mutante $\Delta XAUC_{36880}$, respectivamente, utilizando os primers F1_36880 e R1_36880; **3-4:** Bactéria selvagem e mutante $\Delta XAUC_{36880}$, respectivamente, utilizando os primers F_tRNA-Gln e R1_tRNA-Gln; **5-6:** Bactéria selvagem e mutante $\Delta XAUC_{36880}$, respectivamente, utilizando os primers F_tRNA-Met e R1_tRNA-Met; **C)** controle negativo das amostras; **L)** Padrão de peso molecular Gene Ruler 1Kb Plus DNALadder (Fermentas).

5.5 Análise das curvas de crescimento dos mutantes de XauC *in vitro* e *in planta*

O crescimento dos mutantes *in vitro* e *in planta* dos três mutantes com alterações nos sintomas da cancrose foram avaliados em comparação com a estirpe selvagem XauC W (controle), tanto em meio de cultura com grande aporte de aminoácidos e açúcar (meio NBY), como em condições infectantes (*in planta*) e em

meio de cultura (XVM2) que mimetiza o ambiente apoplástico da planta hospedeira (Chang et al., 2016), denominado por isso de meio indutor.

Quando o crescimento bacteriano foi realizado em condições ideais (NBY e temperatura a 29°C), não houve diferenças significativas na curva de crescimento entre a estirpe selvagem e os mutantes (Figura 14, A). Entretanto, o crescimento em plantas susceptíveis apresentou diferenças no número de células a partir do terceiro dia após inoculação, onde os três mutantes apresentaram limitação no crescimento quando comparados com a estirpe selvagem (Figura 14, B, C e D).

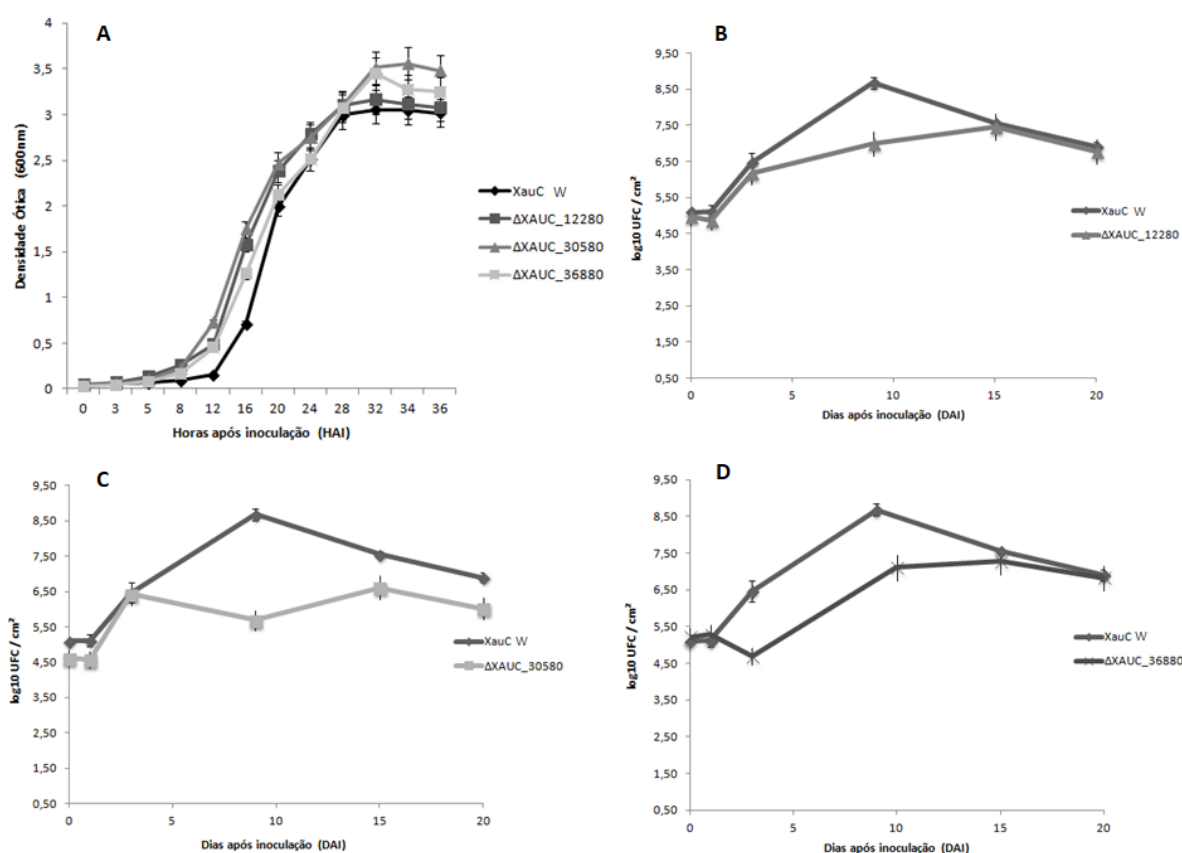


Figura 14 - A) Curvas de crescimento dos três mutantes de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C e estirpe selvagem *in vitro* em meio de cultura NBY; **B)** Curva de crescimento do mutante Δ XAUC_12280 e XauC W *in planta*; **C)** Curva de crescimento do mutante Δ XAUC_30580 e XauC W *in planta*; **D)** Curva de crescimento do mutante Δ XAUC_36880 e XauC W *in planta*. A coleta das amostras ocorreu nos dias 0, 1, 3, 9, 15, 20 e 25 após inoculação.

Ainda, quando foi observado o crescimento bacteriano dos mutantes Δ XAUC_30580 e Δ XAUC_12280 em um meio de cultura XVM2 (que imita as

condições da planta hospedeira), nota-se atraso e redução do crescimento dos mutantes quando comparados com a estirpe selvagem (Figura 15 e 16, respectivamente).

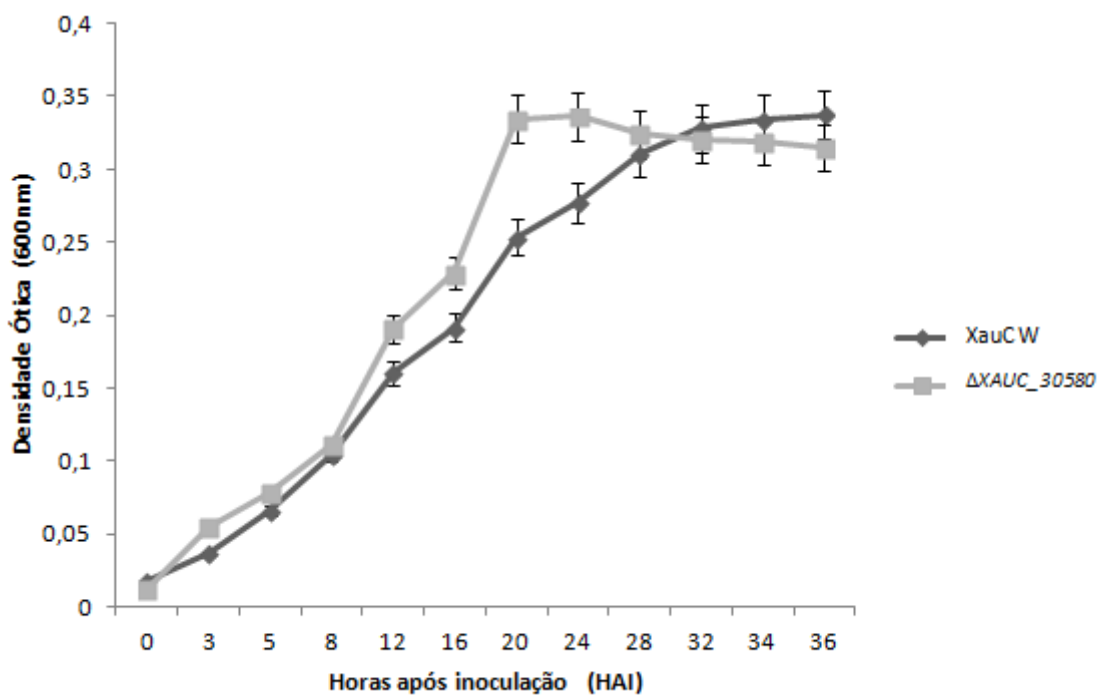


Figura 15 - Curvas de crescimento bacteriano *in vitro* em meio XVM2 do mutante Δ XAUC_30580 e XauC selvagem (XauC W).

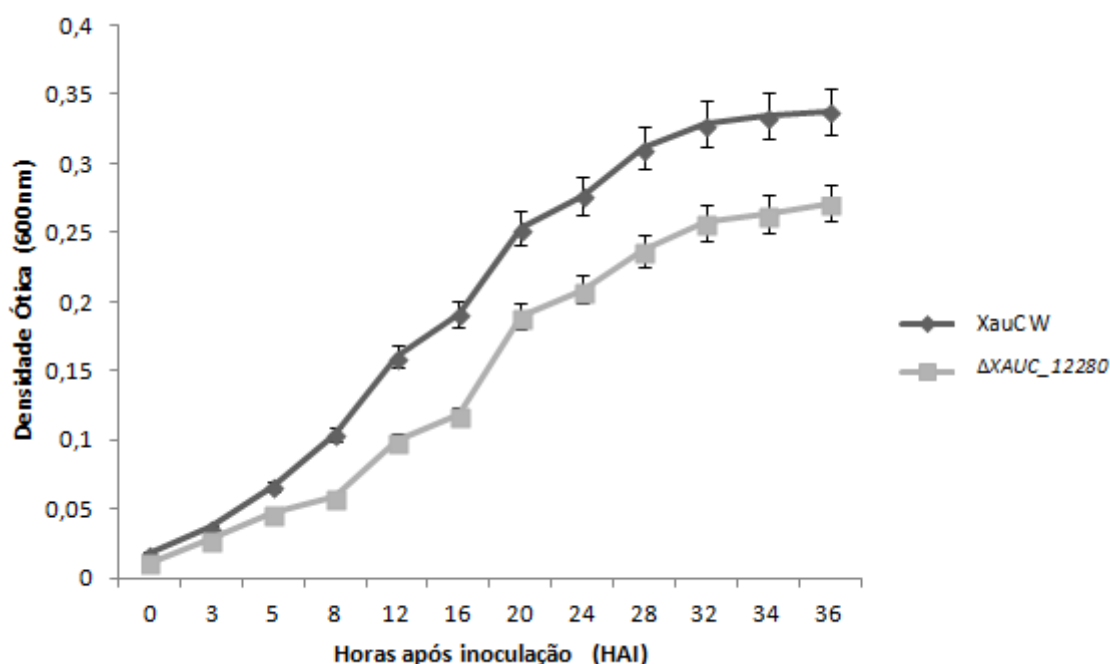


Figura 16 - Curvas de crescimento bacteriano *in vitro* em meio XVM2 do mutante XAUC_12280 (Δ PilY1), e XauC selvagem (XauC W).

5.6 Avaliação da formação de biofilme e capacidade de autoagregação bacteriana

Como pode ser observado na Figura 17, os mutantes XAUC_12280 (Δ PilY1), e Δ XAUC_36880 apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção de biofilme *in vitro* em meio de cultura NBY quando comparados a estirpe selvagem e ao mutante Δ XAUC_30580, o qual não apresentou diferenças significativas na formação de biofilme quando comparado ao controle (estirpe selvagem). Já em meio de cultura XVM2, o mutante Δ XAUC_30580 demonstrou redução na produção de biofilme quando comparado à estirpe selvagem, enquanto no mutante XAUC_12280 (Δ PilY1) não foram observadas diferenças significativas (Figura 18).

A avaliação da capacidade de autoagregação celular demonstrou que, após 24 horas em meio estático, os três mutantes apresentaram uma grande diminuição da agregação das células em suspensão quando comparados com a agregação celular da estirpe selvagem (Figura 19).

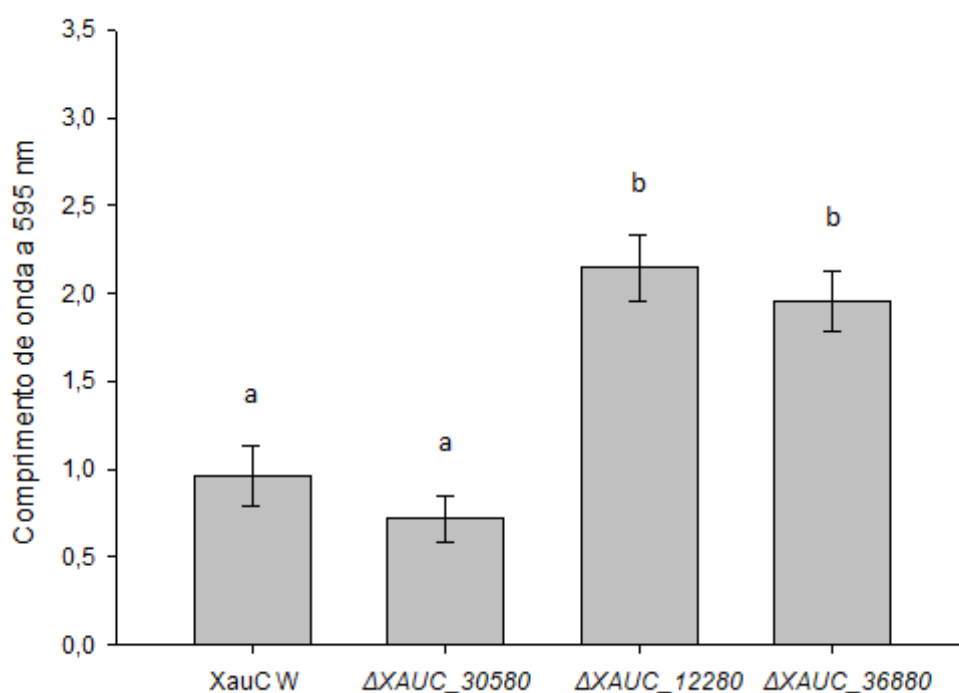


Figura 17 - Quantificação da formação de biofilme *in vitro* em meio de cultura NBY pela XauC e pelos mutantes $\Delta XAUC_{30580}$, $\Delta XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$), e $\Delta XAUC_{36880}$ por meio da leitura da densidade ótica (DO_{595nm}). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

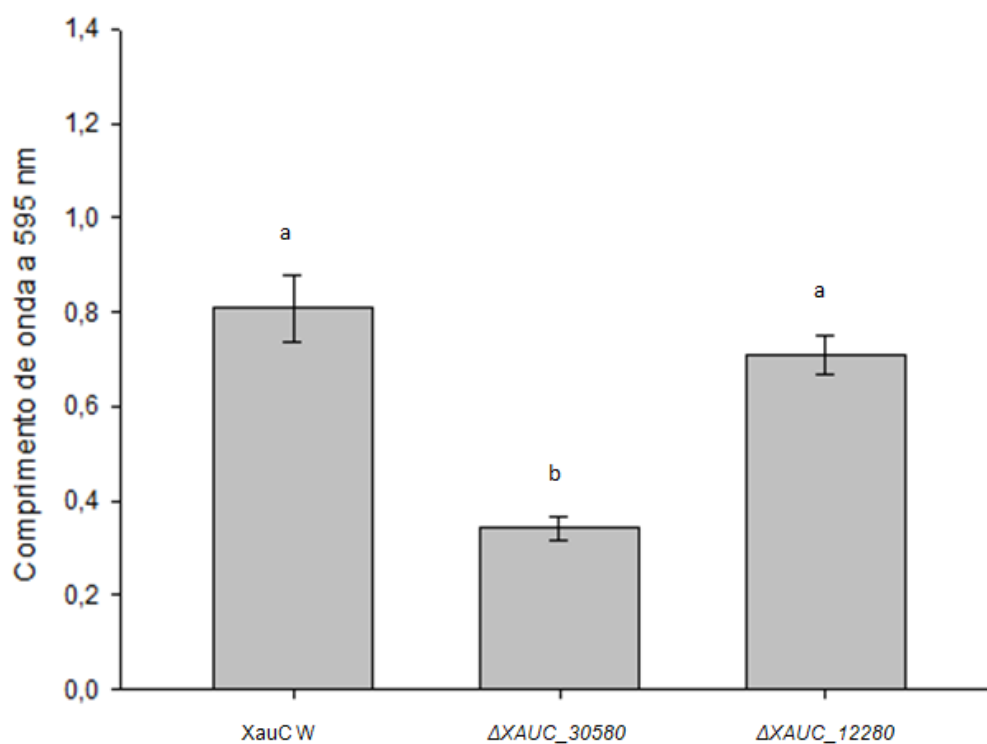


Figura 18 - Quantificação da formação de biofilme *in vitro* em meio de cultura XVM2 pela XauC e pelos mutantes $\Delta XAUC_30580$, $XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$), por meio da leitura da densidade ótica (DO595nm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

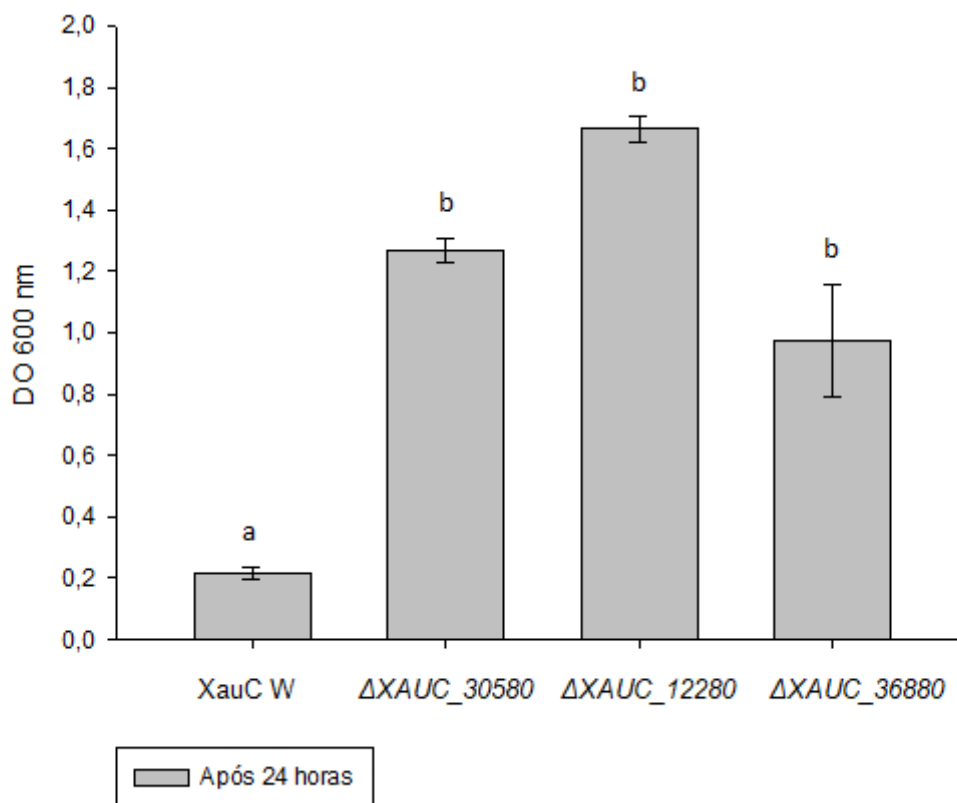


Figura 19 - Quantificação da auto-agregação bacteriana da estirpe selvagem de XauC e os mutantes $\Delta XAUC_30580$, $XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$) e $\Delta XAUC_36880$, respectivamente, através das leituras de densidade ótica (DO 600nm) após 24 horas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.7 Análise da motilidade bacteriana tipo “Twitching”

A análise da motilidade bacteriana tipo “Twitching”, como observado na Figura 20A e 20B, demonstrou uma redução de 86,5% na capacidade de movimentação no mutante $XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$), quando comparado ao controle (XauC) (Tukey 5%).

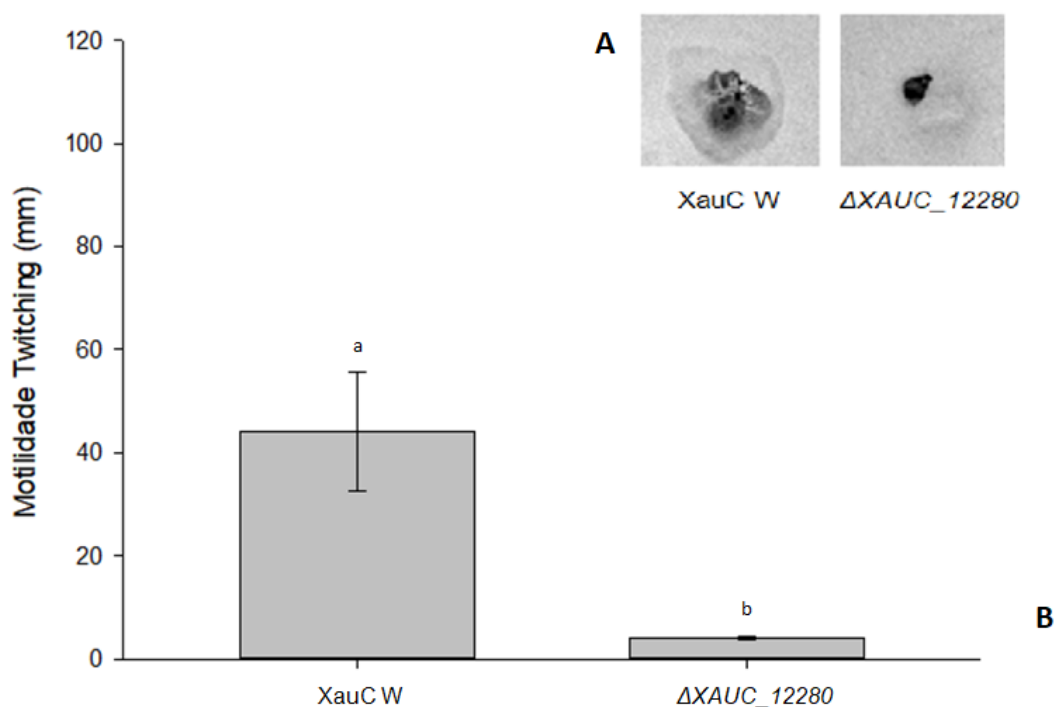


Figura 20 – A) Ensaio da motilidade “Twitching” na superfície de placas de Petri, coradas com cristal violeta (0,3%); **B)** Gráfico demonstrando a redução significativa ($p < 0,05$) da motilidade “Twitching” do mutante $XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$), frente a estirpe selvagem da bactéria. Os dados utilizados correspondem à mensuração das áreas abrangidas pela motilidade “Twitching”. O experimento foi realizado em triplicatas biológicas e técnicas.

5.8 Formação de goma xantana

Como observado na Figura 21, o mutante $\Delta XAUC_{36880}$ produziu mais goma xantana que a estirpe selvagem da bactéria, sendo esta diferença significativa. Os mutantes $\Delta XAUC_{30580}$ e $\Delta XAUC_{12280}$ ($PilY1$) não apresentaram diferenças significativas na produção de exopolissacarídeo em relação à estirpe selvagem.

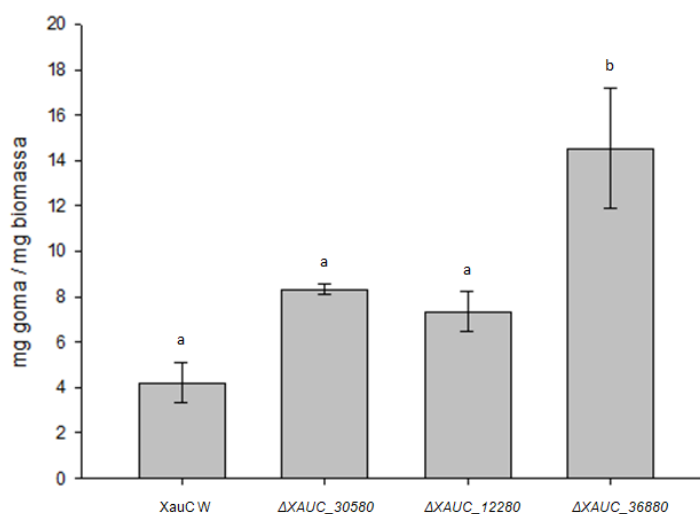


Figura 21: Produção de goma xantana da estirpe selvagem (XauC W) e os mutantes Δ XAUC_30580, Δ XAUC_12280 (*PilY1*) e Δ XAUC_36880, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.9 Síntese dos resultados

Recapitulando e visando uma maior compreensão dos resultados apresentados, um resumo geral pode ser observado na Tabela 4, onde é feita a comparação de desempenho dos mutantes, em todos os testes presentes na metodologia, em relação à cepa selvagem de XauC.

Tabela 4: Comparação dos resultados entre os mutantes Δ XAUC_30580, Δ XAUC_12280 (*PilY1*) e Δ XAUC_36880 em relação a estirpe selvagem.

Metodologia	Δ XAUC_30580	Δ XAUC_12280 (<i>PilY1</i>)	Δ XAUC_36880
Patogenicidade	-	-	-
Crescimento <i>in planta</i>	-	-	-
Crescimento <i>in vitro</i> - NBY	=	=	=
Crescimento <i>in vitro</i> – XVM2	-	-	NA
Auto Agregação	+	+	+
Motilidade	NA	-	NA
Biofilme – NBY	=	+	+
Biofilme – XVM2	-	=	NA
Goma Xantana	=	=	NA

(=), perfil semelhante a estirpe selvagem; (-), perfil reduzido em relação a estirpe selvagem; (+), perfil aumentado em relação a estirpe selvagem; (NA), não avaliado.

6 DISCUSSÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xac), afeta grande parte da produção citrícola mundial, levando às grandes perdas econômicas. A forma mais branda desta doença é denominada cancriose e é causada pela bactéria *X. citri* pv. *aurantifolii* tipos B e C (XauB e XauC). Embora XauB e XauC sejam menos agressivas, sua importância é atribuída à capacidade de infectar apenas espécies específicas de citros, pois estão restritas a determinadas regiões do mundo ou variam consideravelmente em seus perfis de indução de virulência, geralmente mais fracos que os observados para o cancro cítrico.

Por essas razões os genomas dessas bactérias, além de Xac, foram completos ou parcialmente sequenciados, permitindo assim que uma análise genômica comparativa orientasse a busca por genes que possivelmente explicassem o papel das variantes biológicas, levando a uma melhor caracterização do patossistema bem como seus relacionamentos com os respectivos hospedeiros. Até o presente momento temos disponíveis, em banco de dados, seis sequências do genoma de XauC, dois genomas de XauB e diversos genomas de Xac (Da Silva et al., 2002; Moreira et al., 2010; Jalan et al., 2013; Fonseca et al., 2019).

Uma análise comparativa entre os genomas destas espécies revelou que XauC não possui diversos genes-chave dos processos de patogenicidade e virulência presentes em Xac. Entre eles estão genes pertencentes aos sistemas de secreção I e IV e ao *pilus* tipo IV. Esta diferença pode explicar a predominância de Xac nos cultivares de citros, assim como a maior agressividade comparada às espécies causadoras da cancriose tipo B e C (Fonseca et al., 2019).

Com o objetivo de obter uma melhor compreensão do repertório de genes e proteínas associadas à adaptação de XauC e indução de virulência em citros, poucos estudos descreveram o efeito de mutações em genes específicos que prejudicam a virulência do patógeno e as respostas fisiológicas da planta hospedeira sob infecção do patógeno (Gochez et al., 2015; Gochez et al., 2016). Ainda, não existem estudos publicados que descrevam a descoberta de genes relacionados à patogenicidade e virulência no genoma XauC, o que é necessário para um avanço no entendimento da relação desse fitopatógeno com seus hospedeiros.

Como a abordagem de “screening” de mutantes aleatórios *in planta* provou ser útil para a descoberta de genes envolvidos nos processos de patogenicidade e virulência em diversas espécies, incluindo Xac (Jacobs et al., 2003; Laia et al., 2009; Zou et al., 2011), no presente estudo 576 cepas de uma biblioteca de mutantes aleatórios de XauC com 672 mutantes foram inoculados em folhas de seu hospedeiro cítrico, *C. aurantifolia*, e três delas apresentaram redução ou inibição dos sintomas de cancrose nos hospedeiros infectados. Para identificar o local genômico onde o transposon se inseriu, foram realizados amplificação, sequenciamento e análise *in silico* na região adjacente à inserção. Estas análises revelaram dois genes (Δ XAUC_30580, Δ XAUC_12280 (*PilY1*) e uma região intergênica (Δ XAUC_36880) de XauC envolvidos na alteração dos sintomas, os quais serão discutidos separadamente nos tópicos a seguir.

A adesina do pilus tipo 4 (PilY1) é essencial para o estabelecimento de XauC no hospedeiro cítrico

As bactérias empregam uma ampla gama de estratégias para sobreviver em diversos ambientes. Nas bactérias fitopatogênicas, estes ambientes incluem a superfície e interior das folhas de seu hospedeiro. Para tal, são produzidas enzimas hidrolíticas extracelulares e polissacarídeos, adesinas e sistemas de secreção de proteínas que liberam fatores de virulência. Dependendo das condições, as células têm que oscilar entre comportamentos que envolvem fixação a superfícies (outras bactérias, tecido animal ou vegetal, matéria inanimada) e mover-se através de superfícies ou em meio líquido, seja como células individuais ou em grupos (Dunger et al., 2016).

Neste contexto, o *pilus* tipo IV (T4P- *do inglês* Type 4 *Pili*) é um filamento superficial flexível com tamanho entre 4 e 7 nm de diâmetro e vários micrômetros de comprimento que são formados por polímeros helicoidais que incluem subunidades de *pili*. Ciclos de polimerização, fixação e despolimerização do T4P intercedem em vários comportamentos bacterianos dependente do *pilus*, entre eles a movimentação e orientação celular, adesão à superfícies, agregação celular, motilidade de

contração (“Twitching”) e formação de biofilme (Dunger et al., 2014), fatores estes essenciais para o estabelecimento da bactéria no hospedeiro.

A estrutura, genes e função do T4P foi estudado em algumas espécies de patógenos, incluindo *Xanthomonas*. Como em outras bactérias, esses genes são organizados em *clusters* espalhados por todo o genoma bacteriano. A maioria dos genomas de *Xanthomonas* codificam dois homólogos principais de *pili* organizados *em tandem* em um cluster que também contém os genes *pilS*, *pilR*, *pilB*, *pilC* e *pilD*. Os genomas da família *Xanthomonadaceae* também carregam um operon que codifica os homólogos dos *pili* menores *PilE*, *PilX*, *PilW*, *PilV*, *FimT* e o fator/adesina anti-retração *PilY1* (Dunger et al., 2016).

Comparando-se com o genoma de XaC306, os genomas de XauB e XauC não possuem os genes *pilX*, *pilV*, *pilA* e *pilL*, os quais são genes-chave na síntese e regulação do T4P (Fonseca et al., 2019). Portanto, XauC possui pelo menos uma cópia dos demais genes do T4P. Entretanto, nenhum estudo tinha sido realizado até o momento para investigar se suas funções são equivalentes às observadas em outras espécies de patógenos, nem se estão funcionais.

Um dos mutantes selecionados no presente trabalho teve um gene interrompido pela inserção do transposon pertencente ao T4P, o qual possui a sequência idêntica ao fator/adesina anti-retração *PilY1* de Xac e foi, então, identificado como $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$).

A inoculação do $\Delta XAUC_12280$ ($\Delta PilY1$) em folhas do hospedeiro cítrico XauC (*Citrus aurantifolia*) resultou na limitação e redução dos sintomas clássicos de cancrose como necrose e encharcamento, resultantes da hipo e hiperplasia foliar, e apenas no local da inoculação, quando comparados ao controle. Também houve redução no crescimento celular *in planta* e em meio de cultura XVM2, o qual simula o ambiente apoplástico, e não houve diferença no crescimento do mutante em meio de cultura NBY, quando comparados com XauC W. Assim, o gene *PilY1* possui relação com processos de estabelecimento de XauC no hospedeiro, uma vez que apresentou alteração no crescimento somente quando da interação com o patógeno ou em ambiente que simula interação do patógeno com a planta, como ocorre em outros patógenos.

O $\Delta XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$) apresentou redução na motilidade tipo “twitching”, confirmando que este gene possui a mesma função em XauC e em Xac306 (Dunger et al., 2016). A motilidade *Twitching* acontece através da aderência da extremidade distal do *pilus* tipo IV à superfície, seguida da retração da base do pilus. Essa contração provê a força necessária para puxar a célula para frente (Burdman et al., 2011). Com este gene deficiente a bactéria, ao realizar a extensão do pilus, não consegue promover a fixação necessária na superfície foliar, prejudicando a contração que resultaria na movimentação celular. Desta forma, a não dispersão bacteriana deste mutante justifica os sintomas de cancrose presentes apenas no local da inoculação, além de reduzidos.

A motilidade bacteriana é um fator crucial durante o processo de colonização bacteriana. Ao entrar em contato com a superfície foliar, dependendo das condições e dos nutrientes ali disponíveis, as bactérias podem colonizar áreas maiores através da invasão dos tecidos do hospedeiro (Bem-Jacob et al., 1998; Shapiro, 1998). Para isso, ocorre uma interação dinâmica entre superfície foliar e bactéria permitindo a detecção dos sinais ambientais (Fuqua et al., 2001), dando início à produção de biofilme, o qual é formado por, entre outros, camadas de polissacarídeos (LPS) responsáveis por promover a adesão, sobrevivência e movimentação bacteriana (O'Toole et al., 2000; Stoodley et al., 2002).

Em meio de cultura XVM2 (limitado) o $\Delta XAUC_{12280}$ ($\Delta PilY1$) não apresentou alteração na produção de LPS. Entretanto, ao crescer em meio NBY o mutante produziu quantidade maior de LPS e redução na capacidade de agregação bacteriana. Esta formação foi estudada em várias espécies de *Xanthomonas*, incluindo *X. oryzae* pv. *oryzae* (Lim et al., 2008), *X. campestris* pv. *campestris* (Dow et al., 2003), *X. axonopodis* pv. *phaseolus* var. *fuscans* (Jacques et al., 2015) e *X. citri* 306 (Li, Wang, 2011; Malamud et al., 2011; Kraiserlbud et al., 2012; Dunger et al., 2014; Dunger et al., 2016).

Em alguns estudos, espécies de *Xanthomonas* com mutações relacionadas a genes do T4P apresentaram redução na formação de biofilme e aderência de superfície e, entre eles, não está presente o *PilY1* (Dunger et al., 2016). De forma inédita demonstra-se que este gene, em XauC, possui envolvimento indireto na produção de LPS em processo infeccioso. Uma hipótese é que a bactéria, em meio

com disponibilidade de açúcar, tentou compensar a deficiência do fator/adesina anti-retração *PilY1* com maior produção de LPS, visando facilitar a mobilidade de XauC. Entretanto mais estudos são necessários para investigar este interessante processo.

O gene XAUC_30580 possui relação com processos de patogenicidade em XauC

Outro mutante também apresentou um gene mutado relacionado com processos patogênicos em XauC. Essa suposição deriva das avaliações da patogenicidade *in planta* e crescimento bacteriano *in planta* e em meio de cultura NBY. Não houve variação no crescimento bacteriano deste mutante em relação à XauC selvagem (controle) em meio NBY. Entretanto, quando as células mutantes enfrentaram os mecanismos de defesa da planta (crescimento *in planta*), o mutante apresentou crescimento reduzido comparado ao controle, resultando na diminuição do encharcamento, resultante do extravasamento do conteúdo das células do hospedeiro (Figura 1), próprio da cancrese. Ainda, este mutante apresentou redução na produção de LPS em meio XVM2 e na agregação célula-a-célula em meio NBY, o que pode justificar a redução nos sintomas clássicos de cancrese.

A análise do sequenciamento das regiões adjacentes ao local de inserção do transposon revelou que a inserção ocorreu na região codificadora do gene *XAUC_30580*, que codifica a enzima fumarilacetoacetato hidrolase - FAH, membro fundador da superfamília enzimática FAH (Phaneuf, et al., 1991).

Tanto em eucariotos como em procariotos, membros da superfamília Fumarilacetoacetato, os quais compartilham do mesmo domínio - *FAH* -, são responsáveis por catalisar uma variedade de reações e são imprescindíveis na degradação de compostos aromáticos e, entre eles, a tirosina (Weiss et al, 2018). A tirosina é degradada nos organismos visando sua homogeneização. Para tal, há duas vias catabólicas alternativas as quais diferem em procariotos e eucariotos. Em eucariotos, as células acabam convertendo homogentisato em fumarato e acetoacetato, envolvendo a enzima homogentisato dioxigenase, seguida pela maleilacetoacetato isomerase e, por fim, a *FAH*.

Alguns organismos procarióticos, como *Pseudomonas putida*, utilizam-se dessa via, onde o grupamento *Hmg* codifica enzimas catabólicas relevantes como a

homogentisato dioxigenase (*HmgA*), maleilacetoacetato isomerase (*HmgC*) e fumarilacetoacetato hidrolase (*HmgB*), respectivamente (Arias-Barrau, et al., 2004; Milcamps, 1999; Greene, 2014).

O gene XAUC_30580 de XauC é homólogo ao gene *uptA* de Xac com similaridade de 98% entre suas sequências de aminoácidos. Em Xac, a tirosina é degradada através da conversão do homogentisato em 4-maleilacetoacetato pela enzima homogentisato dioxigenase (gene *HmgA*), o qual é convertido para 4-fumarilacetoacetato pela enzima maleilacetoacetato isomerase (gene *uptB*). Posteriormente, o fumarilacetoacetato é convertido em acetoacetato e fumarato (Kegg, 2020) pela enzima fumarilacetoacetato hidrolase (gene *uptA*) (Figura 7). O fumarato, um dos produtos finais, é destinado ao ciclo do ácido cítrico. Em *Yersinia pseudotuberculosis*, foi demonstrado que a desregulação do ciclo do ácido cítrico e secreção de piruvato são fatores importantíssimos para a colonização e, consequentemente, para a patogenicidade dessa bactéria (Bücker, 2014).

Em *Xanthomonadaceae* essas relações não foram demonstradas; entretanto, em condições infecciosas, foi relatado que três das cinco proteínas envolvidas na degradação da tirosina tiveram sua expressão reprimidas em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Entre esses genes, está incluso o gene *uptA*, homólogo ao afetado pelo transposon no mutante Δ XAUC_30580 (Moreira, 2017), levando a inferir que este gene possui importância em processos patogênicos.

A mutação em uma região intergênica afetou a expressão de um gene relacionado a processos patogênicos de XauC

O mutante Δ XAUC_36880, quando inoculado em folhas de lima ácida 'Galego', sofreu diminuição nos sintomas característicos de cancrose, demonstrando redução no encharcamento e necrose foliar resultantes da hiperplasia celular (Figura 3). O crescimento bacteriano em meio NBY demonstrou que o gene interrompido não é um gene de viabilidade para XauC, uma vez que a multiplicação celular do mutante foi igual ao do controle (XauC W). Assim, a redução no processo de desenvolvimento de sintomas de cancrose e seu crescimento celular em folhas

cítricas supõe que esta região mutada possui relações com processos de instalação e colonização do hospedeiro. O sequenciamento revelou que o transposon se inseriu na região intergênica entre os genes *XAUC_36870* e *XAUC_36880*, homólogos aos genes *rpsI* e *nudH* de Xac 306, respectivamente. Nesta região, na fita complementar estão codificadas uma cópia do tRNA para glutamina (Gln) e uma do tRNA para metionina (Met), sendo que a inserção do transposon ocorreu na região entre estes dois tRNAs (Figura 11). Esta inserção não afetou a síntese destes tRNAs e não interferiu também na expressão das proteínas codificadas pelos genes localizados up e downstream à inserção, como demonstrado nos resultados da RT-PCR. Possivelmente, a inserção do Tn5 pode ter ocasionado distorções na conformação estrutural do DNA, podendo ter afetado a expressão de genes subjacentes ou, até mesmo, genes distantes do sítio de inserção. Estudos adicionais precisam ser realizados para esclarecer esta questão.

7 CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste estudo permitiram associar dois genes de XauC com eventos de patogenicidade no hospedeiro *C. aurantifolia*. O gene Δ *XAUC_12280*, que codifica um fator/adesina anti-retração presente em outras espécies de patógenos, tem relação direta com a motilidade tipo *twitching* e indireta com a produção de LPS. O gene *XAUC_30580*, que codifica a enzima fumarilacetoacetato hidrolase – FAH, demonstrou ter relação com processos patogênicos em XauC e, ainda, a mutação na região intergênica a montante do gene *XAUC_36880* afetou indiretamente a ação de algum gene relacionado à processos patogênicos em XauC.

Portanto, este estudo possibilitou a identificação de genes relacionados à patogenicidade e virulência em XauC ainda não descritos nesta bactéria, contribuindo assim para um melhor entendimento da biologia da interação XauC-citrus.

REFERÊNCIAS

- Arias-Barrau E et al. (2004) The homogentisate pathway: a central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology** 186:5062–5077.
- Barken KB et al. (2008) Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Environmental Microbiology** 10: 2331–2343.
- Behlau F, Belasque J (2014) Cancro Cítrico – A Doença e Seu Controle. Araraquara, Brazil: Fundecitrus.
- Ben-Jacob E et al. (1998) **Annual Review of Microbiology**. 52:779-806.
- Berg CM, Berg DE, Groisman EA (1989) Transposable elements and genetic engineering of bacteria. Em: Berg DE, Howe MM Mobile DNA. **American Society for Microbiology** 879–925.
- Berg DE, Davies J, Allet B, Rochaix JD (1975) Transposition of R factor genes to bacteriophage λ . **Proceedings of the National Academy of Sciences** 72:3628-32.
- Boyd LA, Ridout C, O'Sullivan DM, Leach JE, Leung H (2013) Plant pathogen interaction: disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics** 29:233-240.
- Breidenstein, EBM, Khaira B, Wiegand I, Overhage J, Hancock REW (2008) Complex Ciprofloxacin Resistome Revealed by Screening a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant Library for Altered Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 52:4486-4491.
- Brunings A, Gabriel D (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology** 4:141-157.
- Bücker R, Heroven AK, Becker J, Dersch P, Wittmann C (2014) The pyruvate-tricarboxylic acid cycle node: a focal point of virulence control in the enteric pathogen *Yersinia pseudotuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**. 289:30114-30132.
- Burdman S, Bahar O, Parker JK, De La Fuente L (2011) Involvement of Type IV Pili in Pathogenicity of Plant Pathogenic Bacteria. **Genes (Basel)** 2:706–735.

Camargo LEA, Amorin L, Rezende JAM, Bergamim Filho A (2011) Genética da interação planta-patógeno. In: Amorin, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamim FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011.

Cameron DE, Urbach JM, Mekalanos JJ (2008) A defined transposon mutant library and its use in identifying motility genes in *Vibrio cholera*. **National Academy of Sciences**, 105:8736-8741.

Caserta R et al. (2010) Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology** 76:4250–4259.

Chiesa MA et al. (2013) Characterization of a variant of *Xanthomonas citri* subsp *citri* that triggers a host-specific defense response. **Phytopathology** 103:555–564.

Civerolo EL (1984) Bacterial canker disease of citrus. **Journal Rio Grande Valley Horticulture Society** 37:127-146.

Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn B (2016) Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology** 65:792–806.

Costerton JW et al. (1995) Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology** 49:711–45.

Crossman L, Dow JM (2004) Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and infection / Institut Pasteur** 6:623–9.

Cui H, Xiang T, Zhou JM (2009) Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. **Cell Microbiology** 11:1453-1461.

Gabriel DW, Kingsley MT, Hunter JE, Gottwald, T (1989) Reinstatement *Xanthomonas citri* (ex Hasse) and *X. phaseoli* (ex Smith) to species and reclassification of all *X. campestris* pv. *citri* strains **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology** 39:14-22.

Da Silva AC et al. (2002) Compararison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature** 417:459-463.

Daurelio LD et al. Characterization of *Citrus sinensis* transcription factors closely associated with the non-host response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of plant physiology**, 170:934-942, 2013.

Dow JM, Crossman L, Findlay K, He YQ, Feng JX, Tang JL (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 100:995-11000.

Dunger G, Guzzo CR, Andrade MO, Jones JB, Farah CS (2014) *Xanthomonas citri* subsp. *citri* type IV pilus is required for twitching motility, biofilm development, and adherence. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 27:1132–1147.

Dunger G, Llontop E, Guzzo CR, Farah CS (2016) The *Xanthomonas* type IV pilus. **Current Opinion in Microbiology** 30:88–97.

Endres JL, Yajjala VK, Fey PD, Bayles KW (2019) Construction of a Sequence-Defined Transposon Mutant Library in *Staphylococcus aureus*. Em: Ricke S., Park S., Davis M. (eds) Microbial Transposon Mutagenesis. **Methods in Molecular Biology**, 2016:29-37.

Fawcett HS, Bitancourt AA (1940) Observações sobre as doenças dos citros no Paraguay. **O Biológico** 6:289–296.

Fonseca NP et al. (2019) Detection and identification of *Xanthomonas* pathotypes associated with citrus diseases using comparative genomics and multiplex PCR. **PeerJ**. 7:7676.

Fonseca NP, Patané JSL et al (2019) Analyses of Seven New Genomes of *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* Strains, Causative Agents of Citrus Canker B and C, Show a Reduced Repertoire of Pathogenicity-Related Genes. **Frontiers in Microbiology** 10:2361.

Fundo Da Defesa Da Citricultura – FUNDECITRUS. 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> >. Acesso em: 3 de agosto, 2020.

Fuqua C, Matthew R, Parsek E, Greenberg P (2001) Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. **Annual Review of Genetics** 35:439-468.

Gochez A, Minsavage GV, Potnis N, Canteros BI, Stall RE, Jones J (2015) A functional xopAG homologue in *Xanthomonas fuscans* pv. *aurantifolii* strain C limits host range. **Plant Pathology**, 64:1– 8.

Gochez AM, Shantharaj D, Potnis N, Zhou X, Minsavage GV, White FF, Wang N, Hurlbert JC, Jones JB (2016) Molecular characterization of XopAG effector AvrGf2 from *Xanthomonas fuscans* ssp. *aurantifolii* in grapefruit. **Molecular Plant Pathology** 18:405–419.

Gordon JL, Lefeuvre P, Escalon A, Barbe V, Cruveiller S, Gagnevin L, Pruvost O (2015) Comparative genomics of 43 strains of *Xanthomonas citri* pv. *citri* reveals the evolutionary events giving rise to pathotypes with different host ranges. **BMC Genomics** 16:1098.

Gottig N, Garavaglia BS, Garofalo CG, Orellano EG, Ottado J (2009) A filamentous hemagglutinin-like protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the phytopathogen responsible for citrus canker, is involved in bacterial virulence. *PLoS One* 4:e4358.

Gottwald TR, Graham JH, Schubert TS (2002) Citrus canker. The pathogen and its impact. **Plant Health Progress**.

Gottwald TR, Sun R, Riley T, Graham JH, Ferrandino F, Taylor EL (2002) Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. **Phytopathology** 92:361-377.

Greene GH, McGary KL, Rokas A, Slot JC (2014) Ecology drives the distribution of specialized tyrosine metabolism modules in fungi. **Genome Biology and Evolution** 6:121–132.

Grewal RK, Gupta S, Das S (2012) *Xanthomonas oryzae* pv. *oOryzae* triggers immediate transcriptomic modulations in rice. **BMC Genomics** 13:49 -61.

Guo Y. et al. (2011) DSF-mediated quorum sensin plays a central role in coordinating gene expression of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Education** 863:1–102.

Guzzo CR et al. (2009) PILZ Protein Structure and Interactions with PILB and the FIMX EAL Domain: Implications for Control of Type IV Pilus Biogenesis. **Journal of Molecular Biology** 393:848–866.

Hamer L et al. (2001) Recent advances in large-scale transposon mutagenesis. **Current opinion in chemical biology** 5:67-73.

Hare RS et al. (2001) Genetic footprinting in bacteria. **Journal of Bacteriology** 183:169-1706.

Henrichsen J (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. **Bacteriology Reviews** 36:478–503.

Jaciani FJ et al. (2009) Detection of a new bacterium related to *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* infecting swingle citrumelo in Brazil. **Plant Disease** 93:1074-1074.

Jaciani, FJ (2012) **Diversidade genética de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, caracterização molecular e patogênica de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e detecção de *Xanthomonas alfalfae* em citrumelo ‘Swingle’ (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) no Brasil**. 169 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) –Unesp, Jaboticabal.

Jacob TR et al. (2014) Type IV secretion system is not involved in infection process in citrus. **International Journal of Microbiology** 2014:763575.

Jacobs MA et al. (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100:14339-14344.

Jacques MA, Josi K, Darrasse A, Samson R (2005) *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. **Applied and Environmental Microbiology**, 71:2008-2015.

Jalan N et al. (2013) Comparative genome and transcriptome analyses of pathotypes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* provide insights into mechanisms of bacterial virulence and host range. **BMC Genomics** 14:551.

Jalan N, Yan Q, Kgenaru K, Jonesm JB, Graham JH, Wang N (2014) Genomics of *Xanthomonas citri* and Related Species. In: GROSS, D.C.; LICHENSPARK, A.; LOLE, C. **Genomics of Plant-Associated Bacteria**. (Ed.) Springer, p. 151176.

Jia H et al. (2017) Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. **Plant Biotechnol Journal** 15:817–823.

Kakkanat A, Phan MD, Lo AW, Beatson SA, Schembri MA (2017) Novel genes associated with enhanced motility of *Escherichia coli* ST131. **PLoS One** 12(5):e0176290.

Kanehisa M, Sato Y, Furumichi M, Morishima K, Tanabe M (2019) New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Research** 47:590-595.

Kearns, D (2010) A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology** 8:634–644.

Kim KH, Kang YL, Kim DH, Yoon MY, Moon JK, Kim MY, Van Kand LEE SH (2011) RNA-Seq analysis of soybean near-isogenic line carrying bacterial leaf pustule-resistant and susceptible alleles. **DNA Research** 18:483-497.

Kraiselburd I et al. (2012) A LOV Protein Modulates the Physiological Attributes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Relevant for Host Plant Colonization. **PLoS ONE** 7(6): e38226.

Lahaye T, Bonas U (2001) Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. Trends. **Plant Science** 6:479-485.

Laia ML et al.(2009) New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology** 9:12.

Legerme G, Yang E, Esquivel RN, Kiljunen S, Savilahti H, Pohlschroder M (2016) Screening of a *Haloflex volcanii* Transposon Library Reveals Novel Motility and Adhesion Mutants. **Life (Basel)** 6:41.

Lil J, Wang N (2011) Genome-Wide Mutagenesis of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Reveals Novel Genetic Determinants and Regulation Mechanisms of Biofilm Formation. **PloS one** 6:21804.

Lil J, Wang N (2011) The wxacO gene of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* encodes a protein with a role in lipopolysaccharide biosynthesis, biofilm formation, stress tolerance and virulence. **Molecular Plant Pathology** 12:381–396.

Lil J, Wang N (2012) The gpsX gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC microbiology** 12:31.

Lim SH et al (2008) Functional analysis of pilQ gene in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, bacterial blight pathogen of rice. **Journal of microbiology** (Seoul, Korea). 46:214-20.

Malamud F et al. (2011) The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. **Microbiology** 157:819-829.

Marchler-Bauer A et al. (2017) "CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures.", **Nucleic Acids Research**.45(D)200-3.

Mattick JS (2002) Type IV pili and twitching motility. **Annual Review of Microbiology** 56:289–314.

Mello JAF (2016) **Identificação e análise *in silico* de genes de *Xanthomonas fuscans* subsp *aurantifolia* tipo C implicados na patogênese**. 66 f. Trabalho de conclusão de curso referente a graduação em Ciências Biológicas. Unesp, Jaboticabal.

Milcamps A, de Bruijn FJ (1999) Identification of a novel nutrient-deprivation-induced *Sinorhizobium meliloti* gene (hmgA) involved in the degradation of tyrosine. **Microbiology** 935–947.

Mondal KK, Verma G, Junaid MA, Mani C (2015) Rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* employs inducible hrp-dependent XopF type III effector protein for its growth, pathogenicity and for suppression of PTI response to induce blight disease. **European Journal of Plant Pathology** 144:311–323.

Moreira LM, Soares MR, Facincani AP, Ferreira CB, Ferreira RM, Ferro MIT, de Oliveira JCF (2017) Proteomics-based identification of differentially abundant proteins reveals adaptation mechanisms of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during *Citrus sinensis* infection. **BMC Microbiology** 17(1).

Moreira LM, Almeida Jr NF et al (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** 11:1-25.

Moreira LM, Souza RF, De Almeida NF, Setubal JC, Oliveira JCF, Furlan LR, Ferro JA, da Silva ACR (2004) Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annuals Reviews Phytopathology**, Virginia, 42:163-184.

Mur Luis AJ et al. (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. **Journal of experimental Botany** 59:501-520.

Namekata, T. (1971) **Estudo comparativo entre *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., agente causal do cancro cítrico e *Xanthomonas citri* (Hasse) Dow., N.F. SP. *aurantifolii*, agente causal da cancriose do limoeiro Galego**. Tese (Doutorado) USP, Piracicaba.

Ochman H, Gerber AS, Hartl DL (1998) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. **Genetics** 120:621-623.

Oh Y et al. (2008) Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Genome Biology** 9:85.

Okshevsky M, Louw MG, Lamela EO, Nilsson M, Tolker-Nielsen T, Meyer RL. (2018). A transposon mutant library of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals novel genes required for biofilm formation and implicates motility as an important factor for pellicle-biofilm formation. **Microbiologyopen**.7(2):e00552.

Oliveira ACP, Ferreira RM, Ferro MIT, Ferro JA, Chandler M, Varani AM.(2018) Transposons and pathogenicity in *Xanthomonas*: acquisition of murein lytic transglycosylases by TnXax1 enhances *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 virulence and fitness. **PeerJ**. 2018;6:e6111.

Orgad O, Oren Y, Walker SL, Herzberg M (2011) The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. **Biofouling** 27:787–798.

O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, 30: 295-304.

O'Toole GH, Kaplan B, Kolter R (2000) Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology** 54:49-79.

Patané JSL et al. (2019) Origin and diversification of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathotypes revealed by inclusive phylogenomic, dating, and biogeographic analyses. **BMC Genomics** 20, 700.

Petrocelli S. et al. (2012) Modifications of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* lipopolysaccharide affect the basal response and the virulence process during citrus canker. **PloS one** 7:e40051.

Phaneuf D et al. (1991) Cloning and expression of the cDNA encoding human fumarylacetoacetate hydrolase, the enzyme deficient in hereditary tyrosinemia: assignment of the gene to chromosome 15. **American Journal of Human Genetics** 48:525–535.

Reznikoff WS (2006) Tn5 transposition: a molecular tool for studying protein structure-function. **Biochemical Society Transactions** 34:320-23.

Reznikoff W (2002) Tn5 Transposition, p 403-422. Ed: Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz A (ed), **Mobile DNA II. ASM Press.**, Washington, DC.

Rigano L, Siciliano F, Enrique R, Sendín L, Filippone P, Torres PS, Qüesta J, Dow JM, Castagnaro AP, Vojnov A, Marano MR (2007) Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Molecular Plant Microbe Interactions** 20:1222–30.

Rossetti V (1997) Citrus canker in Latin America: a review. **Proceedings of the International Society of Citriculture** 3:918-924.

Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Sechler A, Agarkova I, Stromberg PE, Stromberg VK, Vidaver AK (2005) Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and “var. *fuscans*” of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology** 28:494–518.

Schulze S et al. (2012) Analysis of new type III effectors from *Xanthomonas* uncovers XopB and XopS as suppressors of plant immunity. **New Phytologist** 195:894–911.

Shapiro JA (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annual Review of Microbiology** 52:81–104.

Silva, ACB da (2019) **Caracterização funcional e envolvimento do operon htrA-XAC3983 na patogenicidade e virulência de *Xanthomonas citri* subsp. *citri***. 91 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal.

Souw P, Demain AL (1979) Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology** 37:1186-1192.

Souza DP, Oka GU, Alvarez-Martinez CE, Bisson-Filho AW, Dunger G, Hobeika L, et al. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. **Nature Communications**. 6:6453.

Stall RE, Seymour CP (1983) Canker, a threat to citrus in the GulfCoast states. **Plant Disease** 67:581-585.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology** 56:187-209.

United States Department of Agriculture - USDA. (2020) Citrus: world markets and trade. 2020. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: Julho de 2020.

Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology** 45:472–489.

Vieira FCF et al. (2017) A *Xanthomonas citri* subsp *citri* hypothetical protein related to virulence contains a non-functional HD domain and is implicated in flagellar motility. **Genetics and Molecular Research** 16(3).

Voegel TM, Warren JG, Matsumoto A, Igo MM, Kirkpatrick BC (2010) Localization and characterization of *Xylella fastidiosa* haemagglutinin adhesions. **Microbiology** 156:2172–2179.

Wang X, Preston JF III, Romeo T (2004) The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. **Journal of Bacteriology** 186:2724–2734.

Weiss AKH, Loeffler JR, Liedl KR, Gstach H, Jansen-Dürr P (2018) The fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) superfamily of enzymes: multifunctional enzymes from microbes to mitochondria. **Biochemical Society Transactions**; 46:295–309.

White FF, Yang B, Johnson LB (2000) Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in Plant Biology** 3:291-298.

Yan Q, Wang N (2012) High throughput screening and analysis of genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in citrus canker symptom development. **Molecular Plant–Microbe Interactions** 25:69–84.

Yan Q, Hu X, Wang N (2012) The novel virulence-related gene nlxA in the lipopolysaccharide cluster of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* is involved in the production of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide, motility, biofilm formation and stress resistance. **Molecular Plant Pathology** 13:923–934.

Yan Q, Wang N (2011) The ColR/ColS two-component system plays multiple roles in the pathogenicity of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Journal of bacteriology** 193:1590–9.

Zhang Y, Jalan N, Zhou X, Goss E, Jones JB, Setubal JC, Deng X, Wang N (2015) Positive selection is the main driving force for evolution of citrus canker-causing *Xanthomonas*. **ISME Journal** 9:2128–2138.

Zou H et al. (2011) Construction of a Tn5-Tagged Mutant Library of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* as An Invaluable Resource for Functional Genomics. **Current Microbiology** 62:908–916 .