

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Rafael Augusto Homem

“Análise funcional do sistema de secreção tipo II de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Rafael Augusto Homem
Li. Machado
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular – Área de Concentração Genética de Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Morais do Amaral

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

H752a

Homem, Rafael Augusto
Análise funcional do sistema de secreção tipo II de
Xanthomonas axonopodis pv. *citri* / Rafael Augusto
Homem. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadores: Marcos Antonio Machado, Alexandre
Morais do Amaral.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Mutagênese. 2. Genômica. 3. Cancro citrico. I.
Machado, Marcos Antonio. II. Amaral, Alexandre Morais
do. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. VI. Título.

Título em inglês: Functional analyses of the type II secretion systems from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Palavras-chave em inglês: Mutagenesis; Genomic; Citrus canker.

Área de concentração: Genética de Microrganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Marcos Antonio Machado, Suzete Aparecida Lanza Destéfano, Jesus Aparecido Ferro.

Data da defesa: 08/09/2008.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 8 de setembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Antonio Machado (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano



Assinatura

Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro



Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti.

Assinatura

Prof. Dr. Henrique Ferreira

Assinatura

*Aos meus pais, Antonio Carlos e Mauricia, por serem
exemplos de pessoas de bem e em reconhecimento a todo o
esforço para com a educação dos filhos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Marcos Antonio Machado, pela orientação e oportunidade de realizar esse trabalho no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”.

Ao Dr. Alexandre Morais do Amaral, pela orientação, ensinamentos e valiosas sugestões em todas as fases do desenvolvimento do projeto.

Ao Dr. Adrian Vojnov e aos doutorandos Florência Malamud, Luciano Rigano e Pablo Torres, pela colaboração e importantes contribuições com o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e a todos os funcionários do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, pela agradável convivência e enorme ajuda.

Aos meus pais, Antonio Carlos e Maurícia, e aos meus irmãos, Junior e Daniel, por todo apoio e incentivo, sempre.

Aos grandes amigos de república, Daniel, Eduardo, Evandro, Hélio, Ivo, Maria e Rafael.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade.

A Deus e a Nossa Senhora, pela luz.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2.1 A citricultura e o cancro cítrico.....	9
2.2 O agente etiológico.....	11
2.3 Sistemas de secreção em bactérias.....	13
2.4 Sistema de secreção tipo II.....	15
3 OBJETIVOS GERAIS.....	21
3.1 Objetivos específicos.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos e oligonucleotídeos.....	22
4.2 Mutagênese por recombinação homóloga.....	23
4.2.1 Preparo de células eletrocompetentes de <i>Xac</i>	23
4.2.2 Confeção dos oligonucleotídeos e PCR.....	24
4.2.3 Obtenção das linhagens com mutações únicas.....	26
4.2.4 Obtenção da linhagem com dupla mutação.....	28
4.2.5 Southern blot.....	30
4.3 Análises fenotípicas.....	31
4.3.1 Inoculações e curva de crescimento na planta hospedeira.....	31
4.3.2 Curva de crescimento <i>in vitro</i>	32
4.3.3 Degradação enzimática em placa.....	33
4.3.4 Quantificação de goma xantana.....	34
4.3.5 Análises de formação de biofilme.....	35
4.3.5.1 Ensaios de fixação em superfície abiótica.....	35
4.3.5.2 Análise de microscopia confocal.....	36
4.4 Análise de expressão (RT-qPCR).....	37
4.4.1 Condições de crescimento e recuperação de células bacterianas.....	37
4.4.2 Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA.....	38
4.4.3 PCR quantitativo em tempo real.....	39
4.4.4 Eficiências das reações e validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	40

4.4.5 Condições de qPCR e expressão dos <i>operons</i>	41
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Mutagênese.....	46
5.1.1 Amplificação e clonagem dos fragmentos.....	46
5.1.2 Transformação de <i>Xac</i> e teste em planta hospedeira.....	49
5.1.3 Curvas de crescimento.....	56
5.1.4 Formação de biofilme.....	59
5.1.4.1 Fixação em poliestireno.....	59
5.1.4.2 Microscopia confocal.....	61
5.1.5 Produção de goma xantana.....	64
5.1.6 Ensaio de degradação de compostos em placa.....	65
5.2 Análise de expressão gênica.....	67
5.2.1 Validação das seqüências amplificadas.....	67
5.2.2 RT-qPCR.....	68
5.3 Síntese dos resultados obtidos.....	71
6 DISCUSSÃO.....	72
7 CONCLUSÕES.....	80
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

Análise funcional do sistema de secreção tipo II de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Resumo. O cancro cítrico é uma das mais sérias doenças de citros no mundo, sobretudo nos países onde a citricultura exerce papel influente na geração de empregos e divisas, como o Brasil, o maior produtor mundial de laranjas. Por esse motivo, o agente causal dessa doença, a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), teve seu genoma completamente sequenciado. No genoma de *Xac* foram identificados dois agrupamentos gênicos (*operons*), *xcs*CDEFGHIJKLMN e *xps*EFGHIJKLMND, que codificam para o sistema de secreção do tipo II (SSTII), mecanismo altamente envolvido no processo de patogenicidade em algumas bactérias causadoras de doenças em plantas. Até o momento, não há evidência da função desempenhada por cada conjunto gênico do SSTII de *Xac* e da relação desses com o processo de interação com a planta de citros. Neste estudo foram analisadas as funcionalidades dos dois agrupamentos gênicos do SSTII de *Xac* e sua atividade durante a interação com a planta hospedeira. As análises revelaram que a bactéria utiliza os dois sistemas de forma distinta e com relevância diferenciada durante a interação com a planta, com repercussão no crescimento da bactéria no tecido foliar, sobretudo o *operon xps*. Adicionalmente, foram identificadas contribuições distintas na atividade de degradação dos compostos amido, carboximetilcelulose e proteína. Exames de microscopia revelaram que a bactéria tem sua organização estrutural do biofilme influenciada pelos dois SSTII e análises de expressão gênica revelaram que o *operon xps* apresenta atividade extremamente maior em relação ao *operon xcs*. Estes resultados mostram pela primeira vez a influência independente de ambos SSTII na capacidade patogênica de *Xac*.

Functional analysis of the type II secretion system of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

ABSTRACT. The citrus canker is a major threat to the citrus industry worldwide, especially where the citriculture plays an important role in employments and revenues, like United States and Brazil, the largest orange producing country. Therefore, the causal agent of citrus canker, the Gram negative bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), had its genome completely sequenced. Throughout the genome of *Xac*, two operons (*xps*EFGHIJKLMND and *xcs*CDEFGHIJKLMN) that encompass 11 and 12 different proteins, respectively, for the type two secretion systems (TISS) were identified. These mechanisms are highly involved in pathogenicity and virulence in some bacteria that cause disease in plants. However, so far, there are no studies on the function of these operons in *Xac* and their relationship for the infection process in the citrus plant. In this study, the functions of the two operons that code for the TISS in *Xac* and their activity during the interaction with the plant host were analyzed. The analyses revealed that the bacterium uses both TISS, however in a different fashion during the contact with the leaf tissue and the *xps* operon is highly more active. In addition, the operons were found to be differentially effective on the degradation of starch, carboxymethylcellulose and proteins. Confocal microscopy investigations found that the bacterial organization (biofilm) is influenced by both TISS and gene expression analyses showed a much higher activity of the *xps* operon as compared to the *xcs* group. These results provide the first clear evidence of the independent influence of both TISS in the pathogenic process of *Xac*.

1 INTRODUÇÃO

Embora a bactéria causadora do cancro cítrico, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), apresente uma série de recursos genéticos envolvidos com patogenicidade e virulência (Da Silva *et al.*, 2002), muitos destes fatores não foram experimentalmente avaliados até o momento. Dentre estes recursos está considerável número de genes identificados como envolvidos na virulência da bactéria, sobretudo aqueles que pertencem aos sistemas de secreção, os quais representam em bactérias patogênicas um mecanismo primário de interação com a planta hospedeira.

No genoma de *Xac* foram identificados todos os sistemas de secreção conhecidos em bactérias Gram-negativas. Curiosamente, em *Xac* o sistema de secreção tipo II é representado por dois agrupamentos gênicos (*operons*) distintos, o que é pouco comum em bactérias. Este sistema, em muitos microrganismos, é responsável pela secreção de toxinas e enzimas hidrolíticas que desempenham um papel crucial na interação patógeno-hospedeiro.

Em bactérias do gênero *Erwinia*, o sistema de secreção do tipo II é o principal mecanismo de liberação de fatores de virulência responsáveis pela doença em plantas (Herron *et al.*, 2000; Shevchik e Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003). Entretanto, não há informação na literatura referente à relevância da expressão desse sistema na interação *Xac*-citros.

Supõe-se que a presença de dois sistemas de secreção do tipo II no genoma da bactéria *Xac* represente, de alguma forma, recurso adicional para o sucesso da infecção e colonização dos tecidos da planta hospedeira.

O objetivo desse estudo foi analisar, de maneira funcional, a relevância dos sistemas de secreção tipo II de *Xac* na interação com a planta hospedeira e manifestação dos sintomas de cancro cítrico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A citricultura e o cancro cítrico

No mundo, aproximadamente 7,6 milhões de hectares são destinados ao plantio de citros. O Brasil é o maior produtor dessa cultura, respondendo por aproximadamente 30% da produção mundial de laranja. Cabe ao país também a primeira posição em produção e exportação de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC), com cerca de 60% do volume de suco produzido no mundo (FAO, 2008). A citricultura brasileira movimenta por ano cerca de R\$ 5 bilhões, representando a segunda atividade rural em importância no Estado de São Paulo, menor apenas que a cana-de-açúcar. Somente com o SLCC o país exporta cerca de US\$ 1,5 bilhão e gera 400 mil empregos diretos, com 3 mil frentes de trabalho simultâneas (Fundecitrus, 2008).

Apesar do grande potencial econômico dessa cultura, os citros são suscetíveis a várias doenças, algumas com alto potencial de destruição, como a tristeza, que dizimou milhões de pomares no Brasil na década de 30, a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* (Laranjeira & Palazzo, 1999), e o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) (Brunings e Gabriel, 2003; Graham *et al.*, 2004), além de outras doenças, tais como a leprose, a morte súbita dos citros, a mancha preta e, mais recentemente, o *huanglongbing* (*greening*).

Historicamente, o cancro cítrico tem recebido atenção especial por parte dos produtores, indústrias, governos, técnicos e pesquisadores, pois tem causado drásticos prejuízos para a produção de citros no Brasil e no Mundo (Leite Jr., 2000; Schubert *et al.*, 2001; Brunings e Gabriel, 2003). Recentemente, o Estado da Flórida, principal produtor de laranja dos EUA, apresentou novas ocorrências da doença em seus pomares devido aos efeitos da disseminação do

agente causal por furacões (Irey *et al.*, 2005).

Os sintomas do cancro cítrico são observados em folhas, frutos e ramos jovens, e se caracterizam por lesões circulares do tipo “cancro”, eruptivas, corticosas, de colorações pardas e circundadas por um halo amarelo em folhas e frutos (Figura 1 – C, D, E, F e G). A doença, em estágio avançado, é capaz de causar intensa desfolha e queda prematura dos frutos (Rodrigues Neto e Ribeiro, 2002).

Em virtude do aumento acentuado do número de focos de cancro cítrico após o ingresso no País da larva minadora dos citros, a Portaria MA n.º 291, de 23 de julho de 1997, determinou, através da Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC), a aplicação de um único método de controle para essa doença. Esse método consiste na erradicação das plantas doentes e todas as demais contidas num raio de 30 metros ao redor da planta infectada, ou a erradicação total do talhão, caso o mesmo apresente mais que 0,5% de plantas infectadas (Figura 1 – A e B). Nestes dois casos, o plantio de citros na área erradicada fica proibido por três anos (Rossetti, 2001).

Durante a décima primeira reunião do “Grupo de Trabalho Permanente em Quarentena Vegetal”, realizada em 1995, em Montevideu, o cancro cítrico foi considerado pelo Brasil como praga quarentenária A2 (Rodrigues Neto e Ribeiro, 2002). Uma praga quarentenária é representada por “qualquer agente patogênico com importância econômica potencial para a área posta em perigo e que ainda não esteja presente ou, se estiver, não se encontre amplamente distribuído e sob controle ativo oficial”. A presença de tais patógenos torna passível a imposição de barreira não-tarifária (barreiras fitossanitárias) para a exportação de produtos agrícolas.

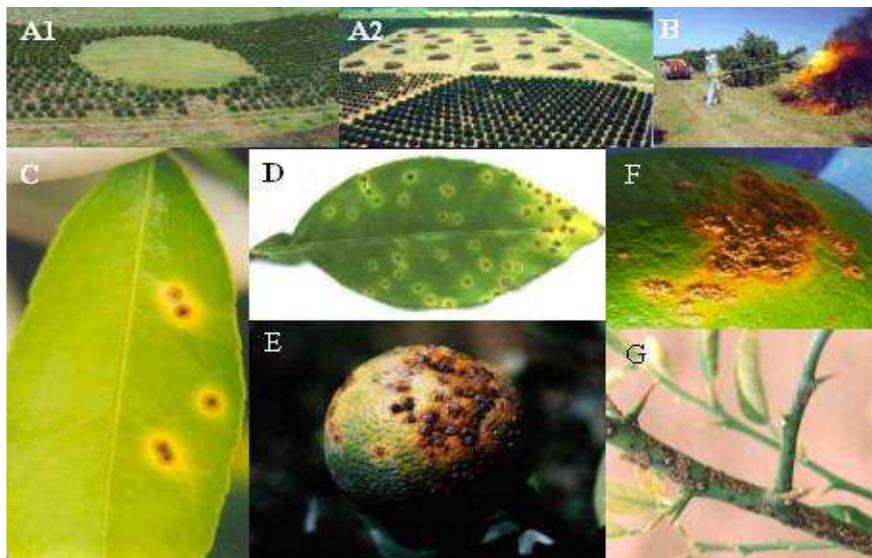


Figura 1. Danos causados pelo cancro cítrico. A: Pomares com áreas de erradicação (A1- talhão com menos que 0,5% de plantas infectadas, A2- talhão com mais de 0,5% de plantas infectadas). B: Queima de plantas infectadas com cancro. C: Folha de laranja doce com sintomas típicos da doença, D: Variedade altamente suscetível (Pomelo) com sintomas. E e F: Frutos jovens com sintomas. G: Sintomas da doença no caule (Fotos C, D: A. M. do Amaral; A1, A2, B, E, F, G: Fundecitrus).

2.2 O agente etiológico

O cancro cítrico é causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) (Vauterin *et al.*, 1995), um procarioto em forma de bastonete, uniflagelado, Gram-negativo e aeróbico obrigatório, que forma colônias amarelas e mucóides em meios de cultura artificiais

(Rodrigues Neto e Ribeiro, 2002).

A bactéria afeta particularmente órgãos em estágios de pleno crescimento, sobretudo folhas, frutos e ramos. Alta umidade e temperaturas em torno de 28° C favorecem seu desenvolvimento, o que torna os climas tropicais e sub-tropicais, ou seja, os ambientes predominantes da citricultura mundial, inclusive no Brasil, altamente favoráveis à sua sobrevivência (Timmer *et al.*, 2000; Pruvost *et al.*, 2002; Vernière *et al.*, 2003). A sobrevivência desta bactéria pode ocorrer até nove meses em folhas de citros caídas, ervas invasoras ou restos de cultura (Rossetti, 2001).

A bactéria é de fácil disseminação e tem a capacidade de colonizar a superfície de citros de maneira epífita, ou seja, sem causar a doença, até poder penetrar nos tecidos do hospedeiro (Graham *et al.*, 2004). Depois de fixada sobre seu hospedeiro, ela inicia o processo de infecção cujo primeiro passo é sua penetração na planta, que pode ocorrer através de orifícios naturais tais como estômatos e hidatódios em tecidos jovens ou por meio de ferimentos mecânicos (rasgos provocados por ferramentas, por insetos, ou pelos próprios espinhos da planta). Em seguida, quando presente no espaço intercelular, inicia um processo de ativação da expressão de genes implicados na patogenicidade e virulência contra o hospedeiro (Duan *et al.*, 1999).

Devido à sua importância econômica, a bactéria teve seu genoma completamente seqüenciado (Da Silva *et al.*, 2002), onde foram identificados, por similaridade de seqüências de proteínas, várias ORFs ("*open reading frames*" ou "sequências de leitura aberta") associadas diretamente ao processo de infecção e que podem permitir a sua sobrevivência e favorecer a sua capacidade de causar a doença em citros. Dentre as seqüências identificadas, 13 apresentaram similaridade com genes associados à degradação de celulose. As proteínas codificadas por esses genes estão entre os principais compostos liberados para o meio externo através do SSTII de

bactérias fitopatogênicas (Russel, 1998). Curiosamente, foram encontrados dois agrupamentos gênicos que, possivelmente, codificam proteínas de dois SSTII e, aparentemente, independentes. Assim como em *Xac*, em *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) também foram encontrados dois grupamentos gênicos para SSTII. Em uma abordagem de mutagênese randômica, foram relatados seis genes do grupamento *xps* (*xpsD*, *xpsE*, *xpsF*, *xpsK*, *xpsL*, e *xpsM*) que, quando mutados, causam redução de virulência. Entretanto, nenhum mutante com alteração de virulência foi encontrado para os 12 genes do grupamento *xcs*. A diferença significativa na taxa de identificação de mutantes para os dois grupamentos sugere que o grupamento *xcs* pode não exercer um papel importante na patogenicidade de *Xcc* (Qian *et al.*, 2005).

2.3 Sistemas de secreção em bactérias

As membranas plasmáticas constituem barreiras essenciais para a manutenção da integridade de bactérias. Entretanto, essas devem ser capazes de suportar o tráfego seletivo de moléculas para dentro e fora da célula. Esse intercâmbio molecular é essencial para a aquisição de nutrientes, captação de material genético exógeno, liberação de enzimas hidrolíticas, adesinas, toxinas, ou biogênese de organelas flagelares. Em bactérias Gram-negativas, devido à presença de duas membranas celulares, o processo de secreção de proteínas se torna mais complexo. Todavia, apesar do grande número, da diversidade e da ampla variedade de funções que desempenham as proteínas secretadas, elas são translocadas por um número limitado de mecanismos (González-Pedrajo e Dreyfus, 2003).

Os sistemas de secreção de proteínas constituem os mecanismos pelos quais as bactérias translocam as proteínas através das membranas celulares. Nas bactérias Gram-negativas esses sistemas estão classificados de acordo com a natureza molecular e funcionalidade em seis grupos,

identificados como sistemas de secreção do tipo I, II, III, IV, V e VI, sendo este último identificado recentemente (Filloux, 2008). Além desses, existem outros dois mecanismos responsáveis pela identificação e transporte de proteínas através da membrana interna até o meio periplasmático, chamados de sistemas *Sec* (de Keyzer *et al.*, 2003) e *Tat* (Berks *et al.*, 2003).

Em bactérias causadoras de doenças em plantas, as proteínas secretadas desempenham um papel central na patogenicidade, virulência e adaptação desses microrganismos. Essas proteínas estão envolvidas em processos de adesão, degradação de compostos de parede celular, supressão de resposta de defesa da planta e liberação de moléculas efetoras no citoplasma de células vegetais.

O exemplo que serve como modelo do sistema de secreção tipo I é aquele descrito para a secreção de alfa-hemolisina por *Escherichia coli*, (Gentshev *et al.*, 2002). Esse sistema é constituído por três proteínas, uma que forma um canal na membrana externa, uma transportadora do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) ancorada na membrana interna e uma proteína de fusão, também ancorada na membrana interna. As proteínas secretadas por bactérias fitopatogênicas através desse sistema são predominantemente proteases, lipases e hemolisinas, entretanto outras proteínas têm sido relacionadas a esse tipo de sistema de secreção, incluindo enzimas que degradam polissacarídeos (York e Walker, 1997).

O sistema de secreção tipo III foi primeiramente identificado em *Yersinia ssp.*, sendo relacionado à secreção das proteínas Yop (*Yersinia* outer membrane proteins) (Michiels, 1990). Aproximadamente 20 proteínas compõem esse sistema, formando estrutura capaz de transportar fatores de virulência diretamente ao citosol da célula hospedeira (Büttner e Bonas, 2002). Além de exercer papel na patogênese, esse sistema também se mostrou necessário para o estabelecimento da relação simbiótica entre *Rhizobium* e plantas leguminosas (Viprey *et al.*, 1998).

Homólogo aos sistemas de conjugação bacteriana e de translocação de ácidos nucléicos, o sistema de secreção tipo IV secreta tanto DNA quanto proteínas (Thanassi e Hultgren, 2000). O exemplo mais estudado desse sistema é VirB de *Agrobacterium tumefaciens*, o qual transporta um complexo nucleoprotéico da bactéria para o interior da célula eucariótica (Cascales e Christie, 2003).

Dentre todos os sistemas de secreção, o tipo V, incluindo o tipo Va ou autotransportadores, o tipo Vb ou via de secreção em duas partes, e o mais recentemente descrito tipo Vc ou autotransportadores tipo II, é considerado, em termos de estrutura, o mais simples sistema de secreção de bactérias Gram-negativas. As proteínas secretadas por esse sistema apresentam alta similaridade em estrutura primária e modo de biogênese, porém desempenham distintas funções interespecíficas, como adesão, degradação de compostos, entre outras (Desvaux, 2004; Henderson *et al.*, 2004).

Recentes estudos identificaram um novo sistema de secreção, chamado de sistema de secreção tipo VI. Esse sistema se mostrou funcional na virulência de alguns patógenos de animais. Mutações em componentes desse sistema causaram atenuação na virulência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholera*, e aumento da virulência de *Salmonella entérica*, (Mougous, 2006; Folkkeson *et al.*, 2002; Pukatzki, 2006).

2.4 Sistema de secreção tipo II

A via geral de secreção de proteínas (GSP – *General Secretary Pathway*) é um modo de translocação onde exoproteínas atravessam sucessivamente, em dois passos, a membrana interna e externa das bactérias Gram-negativas. No primeiro passo, os precursores protéicos contendo um sinal peptídico na extremidade amino-terminal são reconhecidos e transportados através da

membrana interna via um complexo protéico que constitui a maquinaria *Sec* (de Keyzer *et al.*, 2003) ou *Tat* (Berks *et al.*, 2003). Quando presentes na região periplasmática, essas proteínas passam por um processo de maturação, que consiste na quebra do peptídeo sinal e mudanças conformacionais. Essa primeira série de eventos é chamada de via geral de exportação de proteínas (GEP – *General Export Pathway*) (Filloux, 2004). A translocação das proteínas presentes no periplasma para o espaço extracelular pode ser realizada pelo SSTII, ou ramo terminal principal (MTB – *Main Terminal Branch*) GSP. Esse sistema envolve um conjunto de 12 a 16 proteínas, formando um aparato chamado “*secreton*”, responsável pela travessia das exoproteínas para o meio externo (Filloux, 2004; Shiue *et al.*, 2006).

O SSTII foi primeiramente identificado em *Klebsiella oxytoca*, onde se mostrou necessário para a secreção de pululanase, uma enzima de degradação de amido (d’Enfert *et al.*, 1987). Esse sistema é constituído por uma proteína de membrana externa (GspD), responsável pela formação de uma estrutura tipo “poro”; uma proteína citoplasmática do tipo ATPase (GspE), responsável pelo fornecimento de energia ao sistema; uma proteína transmembranar de membrana interna (GspF), que juntamente com outras duas proteínas (GspL e GspM), formam uma plataforma de membrana interna, a qual age facilitando fixação da ATPase, uma proteína do tipo pseudopili principal (GspG) e quatro secundárias (GspH, I, J, K), relacionadas à formação de estruturas do tipo pili; uma peptidase (GspO) responsável pela maturação das sub-unidades do pseudopili, e uma proteína periplasmática, ancorada na membrana interna (GspC), que pode estar envolvida no reconhecimento do substrato e/ou interação com a proteína dos poro de secreção (Filloux, 2004) (Figura 2).

Conservado em grande número de bactérias Gram-negativas e amplamente distribuído entre a família das proteobactérias, o SSTII está implicado na secreção de uma vasta quantidade de proteínas que apresentam distintas características funcionais. Um exemplo é a bactéria *P.*

aeruginosa, a qual, através desse sistema, secreta fosfatases alcalinas, elastases, exotoxinas A, fosfolipases e lípases (Martinez, 1999; Ball *et al.*, 2002). Por sua vez, o SSTII de *V. cholerae* secreta a toxina da cólera, endoquitinases, hemaglutinina-proteases, lípases e neuraminidases (Sandkvist *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 2000; Sandkvist, 2001). Em *X. campestris* pv. *campestris* esse sistema se mostrou funcional para a secreção de endoglucanases, alfa amilases e poligalacturonato liases (Hu *et al.*, 1992).

A degradação da parede celular de plantas, que consiste principalmente da hidrólise enzimática de celulose e pectina, é um mecanismo essencial para a virulência de vários fitopatógenos, especialmente para as espécies do gênero *Erwinia*. Estas espécies causam drástica destruição no tecido vegetal devido à massiva degradação da parede celular (Shevchik e Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003). Na espécie *E. chrysanthemi*, a secreção de enzimas de degradação de parede celular é realizada através do SSTII (Herron *et al.*, 2000).

Em *X. fastidiosa*, bactéria causadora do CVC e extremamente danosa para os citros, dois genes pertencentes ao sistema de secreção do tipo II (*xpsE* e *xpsL*) foram identificados como ativos durante cultivo do patógeno em extrato de folhas de tangerineira, indicando que esse sistema pode exercer papel funcional durante a interação do patógeno com a planta (Coltri e Rosato, 2005).

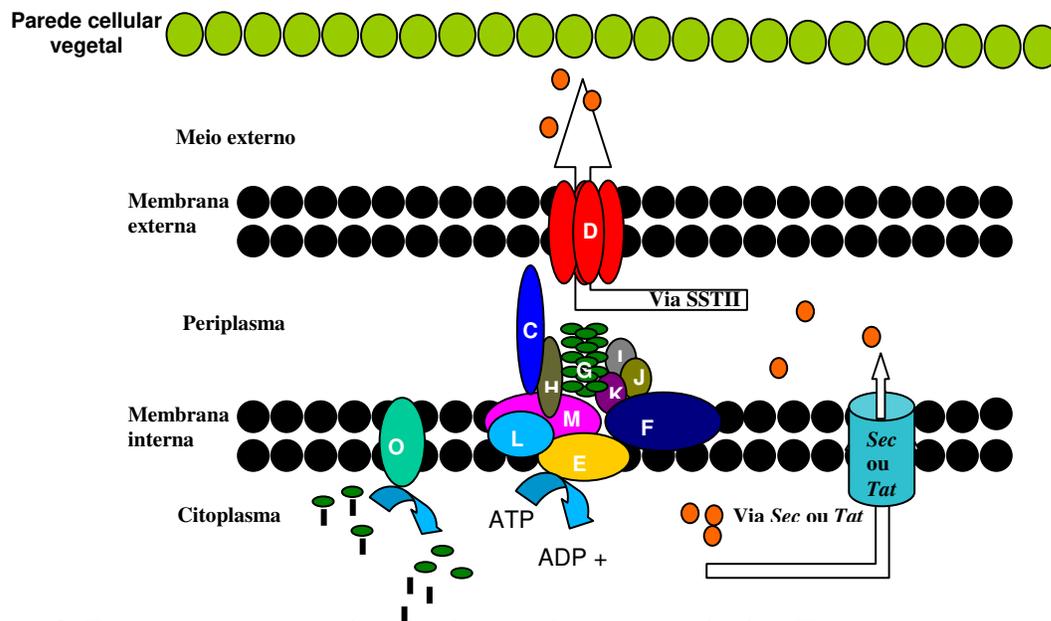


Figura 2. Esquema representativo do sistema de secreção do tipo II.

Os dois agrupamentos gênicos para o SSTII que foram identificados no genoma de *Xac* (*xps* e *xcs*) não apresentam similaridade na sequência de nucleotídeos, sugerindo que essa bactéria apresenta dois SSTII distintos. A falta de similaridade de nucleotídeos entre os agrupamentos gênicos *xps* e *xcs* indica que estes não surgiram por duplicação gênica, e por isso não são parálogos, ou seja, podem desempenhar as mesmas funções, porém não apresentam a mesma origem. O alto grau de homologia de *xcs* e *xps* de *Xac* com *xcs* e *xps* de *X. campestris* pv. *campestris* indica que os mesmos são ortólogos, ou seja, apresentam as mesmas origens e desempenham as mesmas funções (Jha *et al.*, 2005). *X. fastidiosa* apresenta apenas o agrupamento gênico *xps* em seu genoma (Simpson *et al.*, 2000). Entretanto, como observado em estudo comparativo dos genomas de *Xf* e *Xac*, alguns genes que flanqueiam o agrupamento *xcs* em *Xac* são altamente homólogos a genes que apresentam as mesmas posições relativas no genoma de *X. fastidiosa*, sugerindo que, ou *X. fastidiosa* perdeu *xcs*, ou *Xac* adquiriu *xcs* por um processo de transferência lateral. Porém, análises filogenéticas de *xcs* e *xps* sugerem que a

divergência entre esses dois agrupamentos gênicos antecede a divergência entre *X. fastidiosa* e *Xac*, o que reforça a hipótese de que *X. fastidiosa* perdeu *xcs* (Moreira *et al.*, 2004).

Mutações nos agrupamentos *xps* de *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* e *Xac* causaram redução de patogenicidade destas bactérias quando inoculadas em plantas hospedeiras (Hu *et al.*, 1992; Suvendra *et al.* 2000; Qian *et al.*, 2005; Baptista *et al.*, 2006). Porém, mutações no agrupamento *xcs* de fitopatógenos ainda não foram obtidas e seu papel permanece desconhecido.

Em *P. aeruginosa*, um patógeno oportunista muito versátil, que utiliza o SSTII para a secreção de várias proteínas, incluindo lipases, fosfolipases, elastases e a exotoxina A, foi caracterizado um novo agrupamento gênico para SSTII, homólogo ao agrupamento *xcs* de *Xac*. O novo sistema foi relacionado à secreção de uma fosfatase alcalina e apresentou controle de expressão regulado por níveis de fosfato no meio. Esses resultados demonstram que os dois sistemas desempenham diferentes funções, por promoverem a secreção de distintos substratos, e terem a expressão gênica modulada em resposta a diferentes fatores (Ball *et al.*, 2002).

Alguns estudos têm demonstrado experimentalmente a inter-relação do SSTIII, que está diretamente envolvido no processo de patogenicidade, com o SSTII. Em *X. oryzae* pv. *oryzae*, uma proteína secretada pelo sistema tipo II é dependente da expressão da proteína HrpXo, a qual controla a transcrição dos genes do sistema de secreção do tipo III. Essa proteína secretada, que apresentou alto grau de homologia com uma cisteína protease (CysP2) de *Xac* (XAC2853), não se mostrou presente em extratos protéicos, tanto de mutantes para o gene CysP2, quanto para o gene *hrpX* de *X. oryzae* pv. *oryzae*, porém foi secretada pela bactéria selvagem crescida nas mesmas condições. A complementação de um mutante para o gene *hrpXo* com uma construção CysP2-GUS, comparada com a complementação da bactéria selvagem com a mesma construção, reforçou as evidências de uma transcrição HrpXo dependente da proteína CysP2 de *X. oryzae* pv.

oryzae (Furutani *et al.*, 2004).

Pertencentes à via geral de secreção (General Secretary Pathway - GSP) de bactérias Gram-negativas, o SSTII e o sistema pili tipo IV, apresentam muitas características que sugerem uma origem evolucionária comum. Pili tipo IV é um sistema versátil, com importantes funções biológicas, que apresenta uma estrutura filamentosa na superfície de muitas bactérias Gram-negativas. Relacionado com a patogenicidade, e por isso considerado um fator de virulência de vários microrganismos, esse sistema está envolvido nos processos de adesão, motilidade, formação de biofilme, entre outros (Boyd *et al.*, 2008; De la Fuente *et al.*, 2008)

Em estudos onde o SSTII de *Klebsiella oxytoca* foi expresso em *E. coli*, verificou-se a formação de estruturas tipo pili. Essas análises de microscopia comprovaram pela primeira vez que os pseudopili do SSTII são capazes de formar uma estrutura tipo pili, a qual extravasa a membrana externa da bactéria (Sauvonnet, 2000). A super-expressão do gene codificador da principal subunidade do pseudopilus do SSTII de *P. aeruginosa* causou aumento na capacidade de adesão e diminuição na habilidade de secretar exoproteínas. Esses resultados evidenciam a funcionalidade do SSTII desse microrganismo em ambos os processos de adesão e secreção de exoproteínas (Durand, *et al.*; 2003).

3 OBJETIVOS GERAIS

O Sistema de Secreção Tipo II (SSTII) exerce importância funcional na manifestação de muitas doenças, tanto em plantas como em animais, sobretudo devido à secreção de fatores de virulência como enzimas hidrolíticas, toxinas e proteínas de adesão. O sequenciamento completo do genoma de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) identificou dois *operons* codificantes para o SSTII, os quais, até o momento, não foram estudados de maneira funcional.

O presente trabalho teve por objetivo analisar funcionalmente a relevância dos dois *operons* do SSTII de *Xac* no desenvolvimento da bactéria na planta hospedeira e na manifestação do cancro cítrico.

3.1 Objetivos específicos

Produzir mutantes funcionais dos dois *operons* (*xcs* e *xps*) do SSTII de *Xac*.

Avaliar e quantificar o desenvolvimento das linhagens mutantes na planta hospedeira.

Analisar os fenótipos das linhagens mutantes para a secreção de enzimas de degradação, a adesão em superfícies, a capacidade de formação de biofilme e a produção de goma xantana.

Quantificar a expressão dos dois *operons* do SSTII de *Xac* em distintas condições de crescimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos e oligonucleotídeos

Na Tabela 1, estão listadas as linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados nesse estudo, assim como as respectivas características e fontes. Na Tabela 2 estão listados os oligonucleotídeos, suas seqüências, utilização nesse estudo e fonte.

Tabela 1. Linhagens bacterianas e plasmídeos

Linhagens bacterianas e plasmídeos	Características relevantes	Fonte
<i>E. coli</i>	Linhagem DH10B	Gibco
<i>Xac</i> 306	Tipo Selvagem, Ap ^r	R. Leite
306Δ <i>xcsD</i>	Mutante de <i>Xac</i> para <i>xcsD</i>	Este estudo
306Δ <i>xpsD</i>	Mutante de <i>Xac</i> para <i>xpsD</i> , Km ^r	Este estudo
306ΔTn5 <i>xpsD</i>	Mutante de <i>Xac</i> para <i>xpsD</i> por transposon, Km ^r	Baptista, 2006
306Δ <i>xcsDxpsD</i>	Mutante de <i>Xac</i> para <i>xcsD</i> e <i>xpsD</i> , Km ^r , Gn ^r	Este estudo
<i>Xac</i> 306 - GFP	<i>Xac</i> tipo selvagem, GFP, Gn ^r , Ap ^r	Este estudo
306Δ <i>xcsD</i> - GFP	Mutante de <i>Xac</i> para <i>xcsD</i> , GFP, Gn ^r , Km ^r	Este estudo
306Δ <i>xpsD</i> - GFP	Mutante de <i>Xac</i> para <i>xpsD</i> , GFP, Gn ^r , Km ^r	Este estudo
306Δ <i>xcsDxpsD</i> - GFP	Mutante de <i>Xac</i> para <i>xcsD</i> e <i>xpsD</i> , GFP, Gn ^r , Km ^r	Este estudo
pGEM-T	Ap ^r , <i>lacZ</i>	Promega
pGEM-TGENTA	pGEM-T com gene de resistência a gentamicina, Ap ^r , Gn ^r	Este estudo
pUFR047	Km ^r Gn ^r	De Feyter <i>et al.</i> , 1993.
pMP2444	pBBR1MCS-5 com GFPuv, Gn ^r	Stuurman <i>et al.</i> , 2000.
pK18mobGUSII	Derivado do pUC18, <i>lacZ</i> , <i>mob</i> , <i>gusA</i> , Km ^r	Katzen <i>et al.</i> , 1998.
pK18mobGUSIIGENTA	PK18mobGUSII, Km ^r , Gn ^r	Este estudo
pCR 2.1-TOPO	Ap ^r , Km ^r , <i>lacZ</i>	Invitrogen
pCR 2.1-TOPO <i>xcsD</i>	Km ^r , pCR 2.1-TOPO com fragmento do gene <i>xcsD</i>	Este estudo
pCR 2.1-TOPO <i>xpsD</i>	Km ^r , pCR 2.1-TOPO com fragmento do gene <i>xpsD</i>	Este estudo
PCR2.1-TOPOGENTA <i>xcsD</i>	Gn ^r , Km ^r , pCR 2.1-TOPO com fragmento do gene <i>xcsD</i>	Este estudo

Tabela 2. Oligonucleotídeos

Denominação	Sequências 5' – 3'	Utilização	Fonte
xcsD F	GCGAATTCAGCAGCAACTCCTTGATCGT	Mutação de <i>xcsD</i>	Este estudo
xcsD R	GCGAATTCATCGCTTCGACCAATACCT	Mutação de <i>xcsD</i>	Este estudo
xpsD F	GAATTCCAAGGCCGAAAAAGTCTCTG	Mutação de <i>xpsD</i>	Este estudo
xpsD R	GAATTCCACCAGCAGGGTATTGGTCT	Mutação de <i>xpsD</i>	Este estudo
xcsNqPCR F	AATGCACAGGGCCAACTC	qPCR de <i>xcsN</i>	Este estudo
xcsNqPCR R	CGGTGGCATCGAATAGCA	qPCR de <i>xcsN</i>	Este estudo
xpsDqPCR F	CCTTCAATTGTGCGTAATCC	qPCR de <i>xpsD</i>	Este estudo
xpsDqPCR R	ATTTTCCATCCCGACTTATCG	qPCR de <i>xpsD</i>	Este estudo
lrp qPCR F	GGCGACTTCGACTATCTGCT	qPCR de <i>lrp</i>	Cubero <i>et al.</i> , 2003
lrp qPCR R	CCTCTTCCATCACGATGTAGC	qPCR de <i>lrp</i>	Cubero <i>et al.</i> , 2003
pthAF	CCCTCAGTTGGAGGGTAAAA	qPCR de <i>pthA</i>	Cubero <i>et al.</i> , 2003
pthAR	GAAGGGGTCCTCATCTTGTTT	qPCR de <i>pthA</i>	Cubero <i>et al.</i> , 2003
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenciamento	Promega
M13F	CTGGCCGTCGTTTTAC	Sequenciamento	Promega
GentamicinaF	GACGCACACCGTGGAAA	Gene para seleção	Este estudo
GentamicinaR	GCGGCGTTGTGACAATTT	Gene para seleção	Este estudo
Canamicina F	GAAGGGACTGGCTGCTATTG	Confirmação	Este estudo
Canamicina R	AATATCACGGGTAGCCAACG	Confirmação	Este estudo

4.2 Mutagênese por recombinação homóloga

4.2.1 Preparo de células eletrocompetentes de *Xac*

Para a obtenção de mutantes funcionais dos sistemas de secreção tipo II de *Xac*, foram preparadas células competentes da linhagem *Xac306*, a mesma utilizada no sequenciamento completo do genoma (Da Silva *et al.*, 2002). Para tal, a bactéria foi recuperada de cultura permanente (preservada em glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e plaqueada em meio NBY (0,5% peptona, 0,3% extrato de carne, 0,2% extrato de levedura, 0,2% K_2HPO_4 , 0,05% KH_2PO_4 , 1,8% ágar), com a

adição de 100µg/mL de ampicilina. As placas foram mantidas durante 48 horas a 28°C, e com o auxílio de uma alça de platina fez-se uma raspagem das bactérias crescidas, as quais foram transferidas para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio NBY líquido com 10% de glicerol acrescidos de 100µg/mL de ampicilina. Esse pré-inóculo foi mantido a 28°C sob agitação (130 rpm) por aproximadamente 16 horas. Uma alíquota foi utilizada no preparo do inóculo com DO₆₀₀ inicial de 0,1 em Erlenmeyer de 2L contendo 400 mL de meio NBY com 10% glicerol, sem a adição de antibióticos. O crescimento bacteriano foi acompanhado até o cultivo atingir DO_{600nm} de aproximadamente 0,3, correspondendo ao ponto médio da fase exponencial de crescimento.

Após esse período de crescimento, as células foram resfriadas por imersão do Erlenmeyer em gelo durante 1 hora, e em seguida coletadas e lavadas por centrifugação (4.000 xg, 10 min, 4°C) com ressuspensões em 1, 0,5 e 0,25 volume de glicerol a 10 % estéril e resfriado. A última suspensão realizada com 1 mL de glicerol 10 % esterilizado e resfriado e centrifugação a 13.000 xg, durante 2 min e a 4°C. O sobrenadante foi parcialmente removido para permitir apenas a ressuspensão do sedimento bacteriano a uma concentração final de aproximadamente 4x10¹⁰ UFC/mL. Estas foram mantidas no gelo até a transformação.

4.2.2 Confeção dos oligonucleotídeos e PCR

Os alvos para as mutações dirigidas em *Xac* foram os genes (*ORFs*) *xac0695* (*xcsD*) e *xac3434* (*xpsD*), que codificam para proteínas dos poros dos sistemas de secreção tipo II (Figura 3). Para os ensaios de qPCR, os genes escolhidos para as análise de expressão foram aqueles posicionados no final dos *operons xcs* e *xps*. *ORFs*: *xac0705* (*xcsN*) e *xac3534* (*xpsD*) (Figura 3).

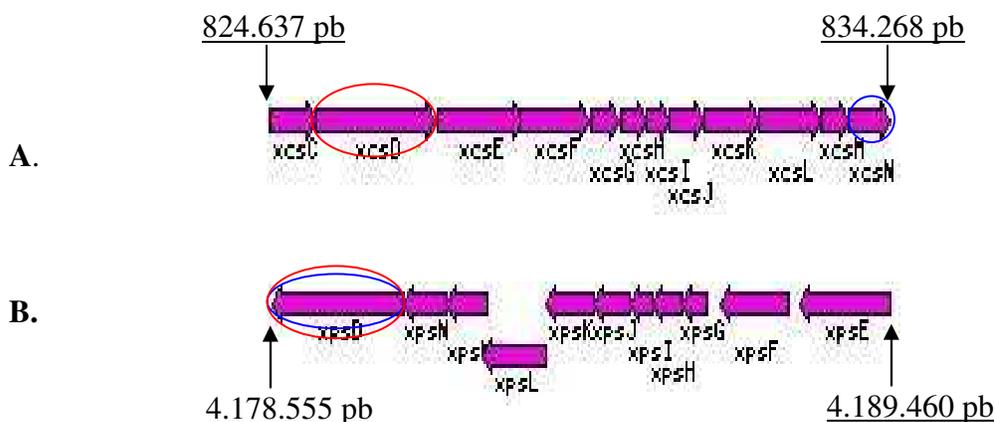


Figura 3. Operons do sistema de secreção do tipo II de *Xac*, com nome indicativo de *ORFs* e posição relativa no genoma. **A.** Operon *xcs* e **B.** Operon *xps*. Em destaque vermelho as *ORFs* escolhidas para mutagênese, e em destaque azul as *ORFs* escolhidas para análise de expressão.

Os critérios para desenho dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos fragmentos de mutagênese em *Xac* foram: amplificação de segmento da *ORF* com mínimo de 100 pb internamente aos terminais amina e carboxil, temperatura de pareamento de 55 °C, comprimento de oligonucleotídeo entre 18 e 25 bases, conteúdo de GC 40-60 %, menos de três nucleotídeos G ou C na extremidade 3' do oligonucleotídeo, ausência de auto-complementariedade. Os tamanhos dos fragmentos gerados para as *ORFs* *xcsD* e *xpsD* foram, respectivamente, 428 pb e 591 pb.

Os parâmetros de amplificação nas PCR foram (para cada reação de 50 µL): 10-30 ng de DNA genômico, 1 X tampão de amplificação, 1 µM de cada oligonucleotídeo, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de mix de dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 55 °C e de 30 seg a 1min, variando conforme o tamanho do fragmento (1000pb / 1min.), a 72 °C, com extensão final de 55 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min. Após separação do produto da amplificação em gel de agarose a 0,8 %, os fragmentos foram

extraídos e purificados com o kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN).

4.2.3 Obtenção das linhagens com mutações únicas

A clonagem dos fragmentos para mutagênese foi realizada em plasmídeo que não apresenta replicação em *Xac*. Para tal, foi utilizado o plasmídeo pCR2.1-TOPO, que apresenta marca de seleção (gene) para resistência a canamicina e ampicilina e gene repórter (*LacZ*).

Primeiramente, 4 μL da solução com os fragmentos de DNA amplificados e purificados foram misturados com 1 μL de solução salina (300mM NaCl, 15 mM MgCl₂), 1 μL do vetor pCR2.1-TOPO (10 ng/ μL), e mantidos durante 5 min. à temperatura ambiente. As ligações foram misturadas com 50 μL de solução com células competentes de *E. coli* DH5- α , mantidas por 5 min em gelo e eletroporadas com o auxílio do aparelho “Gene Pulser II” (BIO RAD), seguindo as seguintes condições: cuvetas de 0,2 cm, resistência *low range* de 200 Ohms, capacitância de 25 μF e voltagem de 2,5 mV. Após recuperação das células transformadas com adição de 1 mL de meio SOC líquido (20 % triptona, 5 % extrato de levedura, 0,584 % NaCl, 0,186 % KCl, 20 mM MgCl₂.6H₂O, 20 mM MgSO₄.7H₂O, 20 mM glicose), durante 45 min a 37 °C e agitação de 200 rpm, estas foram plaqueadas em meio LB sólido (1 % NaCl; 1 % triptona; 0,5 % extrato de levedura) contendo canamicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, X-Gal e IPTG, e mantidas à 37 °C por uma noite.

As colônias selecionadas, ou seja, possíveis recombinantes, foram transferidas, multiplicadas em meio LB líquido contendo canamicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e submetidas à extração plasmidial pelo método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). A confirmação da inserção dos fragmentos foi feita por digestão com *EcoRI*, que cliva regiões do vetor pCR2.1-TOPO que flanqueiam o fragmento inserido, causando assim sua “liberação”. Estas reações foram realizadas nas seguintes condições: 1 μg de DNA plasmidial, 1 X tampão de digestão *EcoRI*, uma unidade

de enzima *EcoRI*, volume final ajustado com água para 15 μL , 37 °C durante 3 h. Em seguida, as digestões foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8 %, e as bandas correspondentes aos fragmentos liberados foram recortadas e purificadas com auxílio do kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN).

Para confirmar a fidelidade das seqüências clonadas, ou seja, que os fragmentos clonados eram iguais às seqüências internas dos genes de interesse de mutação, foram realizadas reações de seqüenciamento seguindo as seguintes condições: 200 ng de DNA das construções no pCR2.1-TOPO (*xcsD* e *xpsD*) foram utilizadas como molde nas reações, onde foram adicionados 5 pmoles de oligonucleotídeos M13 (R ou F), 0,4 μL de *Big Dye*, 2 μL de *Save Money* e água para 10 μL . O processo foi realizado de acordo com as instruções da fabricante para o "DNA sequencing Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing-Ready Reaction", v3.0 (Applied Biosystems) e o seqüenciador utilizado foi o modelo "ABI 3730 Applied Biosystems". As seqüências geradas foram analisadas por comparação com o banco de dados da *Xac* por BLASTn.

As construções que se mostraram positivas foram transferidas por eletroporação para células competentes de *Xac* preparadas no mesmo dia. Após recuperação das células em meio SOC durante aproximadamente 16 horas, estas foram plaqueadas em meio de cultura NBY acrescido de canamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Colônias bacterianas foram isoladas e, após sucessivas repicagens em meio com antibiótico (indicativo de que ocorreu o evento de inserção-duplicação), o DNA dos mutantes foi extraído com o auxílio do "kit" Master Pure DNA Purification Kit (EPICENTRE) e utilizados como molde em PCR para verificação da amplificação do gene de resistência ao antibiótico canamicina (*aph*), presente nos vetores pCR 2.1-TOPO. Estas reações foram realizadas nas seguintes condições: aproximadamente 20 ng de DNA genômico, 10 X tampão de amplificação, 2 μM de cada oligonucleotídeo, 2,0 μL de 50mM MgCl_2 , 0,2 mM de mix de dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (InvitrogenTM), para volume final de 50 μL .

As ampliações foram realizadas em 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min. Os mutantes resultantes foram denominados 306 Δ *xcsD*, 306 Δ *xpsD*.

4.2.4 Obtenção da linhagem com dupla mutação

Com o objetivo de produzir um mutante funcional para os dois SSTII de *Xac*, foi construída uma molécula recombinante que confere resistência ao antibiótico gentamicina, já que os dois mutantes obtidos anteriormente, devido às mutações, são resistentes à canamicina, e *Xac* selvagem é naturalmente resistente a ampicilina.

Os oligonucleotídeos para amplificação do gene de resistência ao antibiótico gentamicina geram fragmento de aproximadamente 855 pb. O DNA molde utilizado nas PCR foi o vetor pUFR047, e a amplificação do fragmento seguiu as condições: 10-30 ng de DNA genômico, 1 X tampão de amplificação, 1 μ M de cada oligonucleotídeo, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de mix de dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. A PCR foi realizada em 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg, com extensão final de 55 °C por 30 seg e 72 °C por 2 min. Após a corrida em gel de agarose a 0,8 %, o fragmento correspondente ao gene de interesse foi extraídos e purificados com o kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN).

Primeiramente esse gene foi clonado no vetor pGEM-T, seguindo os seguintes parâmetros: 4 μ L do fragmento purificado foi misturado com 1 U de ligase, 1 μ L de solução salina (300mM NaCl, 15 mM MgCl₂), 1 μ L do vetor pGEM-T, e mantido durante 5 min. à temperatura ambiente. As ligações foram misturadas com 50 μ L de células competentes de *E. coli* DH5- α , mantidas por 5 min em gelo e eletroporadas com o auxílio do aparelho "Gene Pulser II" (BIO RAD), seguindo as seguintes condições: cuvetas de 0,2 cm, resistência *low range* de 200 Ohms, capacitância de 25 μ F e voltagem de 2,5 mV. Após recuperação das células transformadas com adição de 1 mL

de meio SOC líquido, durante 45 min a 37 °C e agitação de 200 rpm, estas foram plaqueadas em meio LB sólido (1 % NaCl; 1 % triptona; 0,5 % extrato de levedura) contendo gentamicina 5 µg/mL, X-Gal (80 µg/mL) e IPTG (40 µg/mL), e mantidas à 37 °C por uma noite.

As colônias recombinantes foram multiplicadas em meio LB líquido contendo gentamicina a 5 µg/mL e submetidas a extração plasmidial pelo método da lise alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). A confirmação da inserção do fragmento foi realizada por digestão com *PstI* e *SphI*, que clivam regiões do vetor pGEM-T que flanqueiam o fragmento inserido, causando assim a liberação do mesmo. Esta reação foi realizada nas seguintes condições: 1 µg de DNA plasmidial, 1 X tampão de digestão para *PstI*, 1 X tampão de digestão para *SphI*, 1 U de cada enzima, volume final ajustado com água para 15 µL, 37 °C durante 3 h. Em seguida, a digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8 %, e a banda correspondente ao fragmento liberado foi recortada e purificada com auxílio do kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN).

Após a purificação, esse gene foi ligado no plasmídeo Pk18*mob*GUSII, também digerido com as enzimas *PstI* e *SphI*, seguindo as mesmas condições de digestão descritas anteriormente. A clonagem do fragmento seguiu as seguintes condições: 50 ng de fragmento purificado, 10 ng do vetor Pk18*mob*GUSII digerido com *PstI* e *SphI*, 1 X tampão de ligação, 1 U de T4 DNA ligase e volume final ajustado com água para 10 µL. Após 16 horas a 16 °C, todo o volume da reação foi misturado a 50 µL de células competentes de *E. coli* DH5- α , mantida no gelo durante 5 min e transformadas por eletroporação (mesmas condições descritas anteriormente). Os procedimentos para seleção de clones positivos, extração plasmidial e confirmação da inserção dos fragmentos, foram os mesmos descritos para a clonagem no vetor pGEM-T.

Uma nova digestão visando liberar o fragmento clonado foi realizada com as enzimas *BamHI* e *HindIII*, seguindo as seguintes condições: 1 µg de DNA plasmidial, 1 X tampão de digestão *BamHI*, 1 X tampão de digestão *HindIII*, 1 U de cada endonuclease, volume final

ajustado com água para 15 µL, 37 °C durante 3 h. Em seguida, a digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8 %, e a banda correspondente ao fragmento liberado foi recortada e purificada com auxílio do kit "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN).

O fragmento purificado foi clonado na construção pCR2.1TOPO-*xcsD*, obtendo-se assim a construção PCR2.1-TOPOGENTA*xcsD*, a qual foi transformada em células competentes do mutante 306ΔTn5*xpsD* (Baptista, 2006), seguindo os mesmos procedimentos de transformação de *Xac* descritos anteriormente. As colônias recombinantes em meio com gentamicina foram isoladas e repicadas sucessivas vezes em meio NBY acrescido dos devidos antibióticos. A confirmação do único evento de inserção e, conseqüente mutação do gene de interesse, foi realizada por PCR e *Southern blot*. O novo mutante recebeu o nome de 306Δ*xcsD**xpsD*.

4.2.5 Southern blot

Visando confirmar o evento único de recombinação homóloga, com conseqüente integração completa do plasmídeo, e mutação dos genes de interesse, foram conduzidos experimentos de *Southern blot*. Para isso, aproximadamente 5 µg de DNA genômico da linhagem de *Xac* selvagem (*Xac306*) e dos mutantes foram digeridos com a enzima *HindIII*, que cliva o plasmídeo pCR 2.1-TOPO em um único ponto e, no caso da construção PCR2.1-TOPOGENTA*xcsD*, entre os genes de resistência a canamicina e gentamicina. Os DNA digeridos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e transferidos para membrana de nylon HybondTM-N (Amersham Biosciences) em 5 M de NaOH, com subseqüente “cross-linking” por exposição a irradiação de UV. As hibridações foram realizadas a 65 °C, durante uma noite, no equipamento “Hybridizer HB – 1000” (UVP[®] Laboratory Products) (Sambrook *et al.*, 1989). A hibridação foi realizada com o kit “DIG DNA Labeling and Detection” (Roche

Diagnosis, Indianapolis, Ind.), utilizando-se como sondas os produtos de PCR dos genes de resistência a canamicina (422 pb) e gentamicina (855 pb) marcados com digoxigenina, utilizando os oligonucleotídeos Canamicina F/R e GentamicinaF/R, respectivamente.

O mesmo processo foi realizado utilizando DNA das linhagens bacterianas digeridos com a enzima *Bam*HI, que também cliva as construções em único ponto, porém, não entre as seqüências de canamicina e gentamicina. Considerando que as inserções dos plasmídeos ocorreram nos locais desejados, *in silico* foram gerados mapas de restrição para as digestões com *Hind*III e *Bam*HI e hibridação com as sondas de canamicina e gentamicina. Os resultados foram analisados comparando-se os tamanhos dos fragmentos hibridados contra os tamanhos dos fragmentos esperados para as digestões com cada uma das enzimas.

4.3 Análises fenotípicas

4.3.1 Inoculações e curva de crescimento na planta hospedeira

As análises de virulência foram realizadas em plantas de laranja Pêra (*Citrus sinensis* L. Osb.) moderadamente suscetível ao cancro cítrico e Pomelo (*C. paradisi*), altamente suscetível ao cancro cítrico, mantidas em casa-de-vegetação, no setor de bacteriologia do Instituto Biológico, em Campinas-SP.

Para as análises fenotípicas qualitativas, suspensões bacterianas diluídas em solução salina (NaCl 0,85 M) para concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL foram infiltradas com seringas de 1 mL e depositadas, com auxílio de bastões de algodão (cotonetes), em toda superfície abaxial de folhas jovens. A formação dos sintomas foi acompanhada e fotodocumentada periodicamente. Para as infiltrações com seringas, os mutantes foram

inoculados do lado esquerdo das folhas e a bactéria selvagem do lado direito. Quando inoculadas com o auxílio de cotonetes, folhas independentes foram utilizadas para a linhagem selvagem e para os mutantes. Para cada linhagem, foram utilizadas pelo menos seis folhas com tamanho e conformação semelhantes entre si.

Para quantificar as alterações sintomáticas causadas pelas linhagens mutantes na planta hospedeira, foram conduzidos experimentos para monitorar a cinética de infecção das diferentes linhagens. Para isso, com o auxílio de instrumento perfurador (10 agulhas em 1cm²), foram realizados ferimentos em três regiões do limbo na mesma folha, sendo três folhas amostradas por dia de coleta. Suspensões bacterianas com concentração aproximada de 10⁴ UFC/mL foram depositadas com o auxílio de cotonetes, sobre os ferimentos causados pelo instrumento perfurador. Nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 14 e 21 após as inoculações, três folhas inoculadas com as distintas linhagens (WT, 306Δ*xcsD*, 306Δ*xpsD*, 306Δ*xcsDxpsD*) foram destacadas das plantas, desinfestadas e tiveram as áreas inoculadas destacadas com o auxílio de um furador de 1cm² de área. Esses discos destacados foram macerados em solução salina estéril (NaCl 0,85 %) , e após as diluições seriadas necessárias foram plaqueados em meio de cultura NBY sólido com os devidos antibióticos. Após 48 horas de crescimento a 28 °C, as colônias foram contadas e após as devidas conversões, os dados foram inseridos nas curvas de crescimento.

4.3.2 Curva de crescimento *in vitro*

Para quantificar o crescimento das linhagens mutantes em condição ótima para o desenvolvimento de *Xac*, foi conduzido experimento onde, de maneira indireta, através de leituras da absorbância, acompanhou-se o desenvolvimento das linhagens bacterianas.

Para tal, pré-inóculos das linhagens mutantes e selvagem foram crescidos em meio NBY

acrescido dos devidos antibióticos durante uma noite a 28 °C e 200 rpm em tubos de crescimento do tipo Falcon. Os mesmos foram utilizados para inocular novos cultivos com DO_{600nm} inicial de 0,02, os quais foram incubados a 28 °C e 200 rpm. A medição da DO_{600nm} foi realizada nos tempos 0, 6, 12, 24, 30, 36, 48 e 54 horas após inoculação. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em um gráfico de curva de crescimento com os respectivos desvios das médias.

4.3.3 Degradação enzimática em placa

Para analisar o efeito das mutações sobre a secreção de enzimas hidrolíticas, os mutantes obtidos foram avaliados quanto ao potencial de degradação de caboximetilcelulose (CMC), proteína e amido. Para isso, suspensões das bactérias foram ajustadas para uma DO_{600nm} de 0,3 e, com auxílio de micropipeta, 5 µL das amostras foram depositadas em placas com meio de cultura sólido (NaNO₃ 0,1%, K₂HPO₄ 0,1 %, KCl 0,1 %, MgSO₄ 0,05 %, glicose 0,1 %, ágar 1,7 %) acrescido de 0,5% (peso/volume) de CMC, ou leite em pó, ou amido de milho. Após crescimento a 28 °C até a formação das colônias individualizadas (aproximadamente 48 horas), os diâmetros das colônias foram medido, assim como os diâmetros dos respectivos halos de degradação.

Para visualização dos halos de degradação de CMC, após a medição dos diâmetros das colônias, foi realizada a remoção das mesmas por lavagem com água e, em seguida, adicionou-se solução do corante Vermelho do Congo 0,1% (peso/volume em água). Após 30 minutos essa solução foi removida e o meio de cultura foi lavado com solução de NaCl 1M durante 15 minutos, possibilitando a medição dos halos de degradação, por diferenciação de coloração. Os halos de degradação dos meios com amido de milho e leite em pó foram visualizados sem a adição de corantes.

Os experimentos foram realizados em triplicata, com oito repetições por placa, com a presença da bactéria selvagem como controle positivo. Os resultados, convertidos em índices enzimáticos pela fórmula $H^2 - C^2 / C^2$ (H = diâmetro do halo de degradação, C = diâmetro da colônia), foram comparados com os obtidos para a bactéria selvagem, e analisados pelo teste t de médias a 0,05% de significância.

4.3.4 Quantificação de goma xantana

Para estimar a produção de goma xantana das linhagens bacterianas em estudo, essas foram cultivadas a 28 °C e 200 rpm em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Cadmus líquido (0,5 % peptona, 0,3 % maltose, 0,3 % extrato de levedura, 1 % glicose). Após os cultivos bacterianos atingirem a fase estacionária de crescimento (aproximadamente $DO_{600nm} = 2,0$), as bactérias foram separadas do sobrenadante por centrifugação de 30 minutos a 7.000 xg.

Aos sobrenadantes foram adicionados KCl, para concentração final de 0,5% (P/V), e 2 volumes de álcool etanol absoluto. Os precipitados (goma xantana) foram separados por centrifugação a 7000 xg por 10 minutos, liofilizados e submetidos a pesagem em balança de precisão. As células bacterianas também foram liofilizadas e pesadas em balança de precisão. Os experimentos foram feitos em triplicata e os resultados foram analisados de maneira relativa. As razões de peso de matéria seca de goma xantana por peso de matéria seca de células bacterianas.

4.3.5 Análises de formação de biofilme

4.3.5.1 Ensaios de fixação em superfície abiótica

Para avaliar a capacidade de formação de biofilme, analisou-se a capacidade de adesão inicial das linhagens bacterianas em superfície abiótica. O método utilizado consiste na quantificação colorimétrica do biofilme marcado com corante cristal violeta. Para isso as linhagens bacterianas em estudo foram multiplicadas em meio NBY líquido, a 28 °C, sob agitação de 200 rpm, durante 24 horas. Esses cultivos bacterianos foram utilizados no preparo de novos cultivos em meio mínimo YMM (0,1% MgSO₄ 7H₂O, 0,22% CaCl₂ 5H₂O, 0,22% K₂HPO₄, 0,02% FeCl₃, 1% glicose), com DO_{600nm} inicial de 0,05. Esses cultivos foram distribuídos em microplacas de 96 poços de poliestireno (ELISA), com oito repetições de cada cultivo bacteriano por placa, e 150µL por “poço”.

As placas foram mantidas a 28 °C, sem agitação, e, após 24, 48 e 72 horas de crescimento, fez-se a medição da DO_{600nm} e em seguida, o ensaio colorimétrico com cristal violeta, que consiste na retirada dos cultivos bacterianos, lavagem dos poços com 200 µL de solução de NaCl 0,9 %, secagem e adição de 150 µL de solução de cristal violeta 0,1 % em cada poço. Após incubação por 30 min, fez-se a retirada do corante, seguida de lavagem com 200 µL de água destilada e secagem dos poços. Para quantificar, de uma maneira indireta, a quantidade de bactérias fixadas na superfície de poliestireno, considerando que o cristal violeta fica impregnado nessas bactérias aderidas ao substrato, adiciona-se a cada poço 150 µl de etanol 70% e, após período de dissolução do cristal violeta, faz-se a leitura da DO_{590nm} em leitor de ELISA.

Os resultados foram analisados de maneira relativa para os valores de crescimento bacteriano e quantidade de cristal violeta, ou seja, cada poço apresentou uma densidade ótica para

o crescimento bacteriano e uma densidade ótica para a quantidade de cristal violeta. O resultado final, expressando a média das razões de DO_{590nm} do cristal violeta por DO_{600nm} do crescimento bacteriano foi ilustrado em um gráfico de barras com os respectivos desvios-padrão das médias para as oito repetições. Foram realizados três ensaios independentes.

4.3.5.2 Análise de microscopia confocal

Microscopia confocal por varredura laser foi utilizada para analisar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* das linhagens bacterianas. A técnica foi realizada como descrito em estudos anteriores (Russo *et al.*, 2006), com adaptações. Primeiramente foram preparadas células eletrocompetentes das linhagens selvagem e mutantes, da mesma maneira descrita anteriormente, e essas foram transformadas com o vetor pMP2444 (Stuurman *et al.*, 2000) que expressa o gene GFP (Green Fluorescent Protein) e o gene de resistência a gentamicina. As bactérias transformadas foram selecionadas em meio contendo gentamicina na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ e a confirmação das transformações foi realizada por visualização contra luz ultravioleta.

As linhagens fluorescentes foram cultivadas em meio indutor de biofilme YMM e gentamicina a 20 $\mu\text{g/mL}$ durante uma noite a 28 °C. No dia seguinte esses cultivos foram diluídos nesse mesmo meio para uma DO_{600nm} de 0,004 e alíquotas de 500 μL foram transferidas para câmaras de crescimento constituídas de uma base de 1 μm de espessura de borossilicato (n^o. 155411; Lab-Tek, Nunc, Naperville, IL, U.S.A.). As câmaras foram mantidas em ambiente esterelizado com alta umidade relativa, para evitar evaporação do meio, a 28 °C, sem agitação.

A formação de biofilme foi acompanhada por varredura laser em microscópio óptico confocal invertido (LSM510-Axiovert 100M; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) até 76 horas

após inoculação das bactérias nas câmaras de crescimento. O ensaio foi repetido duas vezes e representações tridimensionais das imagens foram geradas no programa Zeiss LSM Image Browser, version 3.2.0.

4.4 Análise de expressão (RT-qPCR)

4.4.1 Condições de crescimento e recuperação de células bacterianas

Células de *Xac* selvagem foram recuperadas de cultivos nos seguintes meios: NBY (meio complexo e rico, onde a bactéria se multiplica rapidamente), XVM2 (indutor de genes *hrp* em *Xac*) (Astua-Monge *et al*, 2005) e YMM (meio mínimo definido e indutor de formação de biofilme em *Xac*) (Rigano *et al*, 2007). O crescimento bacteriano nos meios artificiais foi realizado a 28 °C e 140 rpm, por cerca de 24 horas para o meio NBY e 50 horas para XVM2 e YMM, ou até atingirem a DO₆₀₀ de 0,3.

Para os experimentos *in vivo* (em planta hospedeira), a bactéria selvagem foi coletada por raspagem com alça de platina de cultura nova (48 horas a 28°C) em meio sólido acrescido de ampicilina e ressuspendida em solução de NaCl 0,85M. Essa suspensão bacteriana foi ajustada para uma concentração aproximada de 10⁸ UFC/mL (DO_{600nm} de 0,6) e infiltrada com seringas hipodérmicas esterilizadas, na maior área possível, de 30 folhas de cada planta (três plantas distintas) de laranja Pêra.

Após sete dias da inoculação, as folhas foram destacadas, desinfestadas em álcool 70% e solução de hipoclorito a 1000 ppm, tiveram as nervuras centrais retiradas e, com o auxílio de tesoura foram recortadas em tiras finas. As folhas recortadas foram mantidas em solução salina gelada durante aproximadamente 1 hora, permitindo assim a liberação da bactéria do tecido

vegetal. Após esse período, utilizando um filtro feito de gaze e um funil de vidro, as soluções contendo as bactérias foram separadas das folhas e transferidas para garrafas de centrífuga de 250 mL. Em seguida as bactérias foram coletadas por centrifugação de 20 min, a 4.000xg e 4°C, e foram mantidas resfriadas até a extração de RNA.

4.4.2 Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA

As extrações de RNA foram feitas com o kit “RNeasy” (QIAGEN) e seguiram as instruções do fabricante. A qualidade e integridade dos RNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida desnaturante (20mM MOPS pH 7,0; 5mM acetato de sódio; 5mM EDTA; 3% formaldeído) e visualização das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 16S e 23S.

Após quantificação dos RNA em espectrofotômetro (260nm), esses foram tratados com DNase, adicionando-se os seguintes componentes para cada 1 µg de RNA: 1 µL de tampão de DNase 10X, 1 µL de DNase (1 U/µL) e água DEPC (0.1% dietilpirocarbonato) para um volume final de 10µL . Estas reações foram incubadas a 25 °C durante 15 minutos e, em seguida, objetivando-se inativar as reações, foi adicionado 1 µL de EDTA a cada reação, as quais foram mantidas à 65 °C durante 10 minutos.

Para confirmar a degradação das moléculas de DNA foram realizadas PCR conforme os procedimentos: para cada 1 µL de solução contendo RNA adicionaram-se 2,5 µL de tampão de amplificação 10X, 1 µM de cada oligonucleotídeo (*pthA F* e *pthA R*), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de mix de dNTP e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. As reações foram realizadas em 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 60 °C por 30 seg e 72 °C por 30 seg, com um ciclo final de 65 °C por 30 seg e 72 °C por 7 min. Os resultados das PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%,

sempre com a presença de um controle positivo (DNA de *Xac* selvagem como molde na reação). Apenas os RNA das reações que não apresentaram amplificação foram utilizados nos passos seguintes.

A síntese dos cDNA foram realizadas conforme a técnica de RT-PCR com oligonucleotídeos randômicos descritos por Benders *et al.* (2005), nas seguintes condições: solução contendo 1 µg de RNA total, 0,5 µL de *random primer* a 3 µg/µL, 1 µL de dNTP 10 mM e água DEPC para 12 µL, foi mantida durante 15 min a 65 °C e, em seguida, colocada no gelo por 3 min. Uma mistura contendo 4 µL de tampão *first-strand* 5X, 2 µL de DTT 0,1 M, 0,5 µL de “RNase out” e 1 µL da enzima transcriptase reversa M-MLV RT, foi adicionada à reação e mantida a 37 °C durante 50 minutos, passando para 72 °C durante 10 minutos.

Para confirmar a síntese das moléculas de cDNA foram realizadas PCR nas mesmas condições descritas para as confirmações de degradação de DNA, agora utilizando como molde 1 µL da solução com cDNA. As confirmações das amplificações foram visualizadas em gel de agarose 2% submetido à eletroforese, onde foram comparadas com a amplificação obtida na reação contendo DNA de *Xac* selvagem. Os produtos das transcrições reversas (cDNA) foram utilizados para as análises de expressão por qPCR.

4.4.3 PCR quantitativo em tempo real

Essa técnica se baseia no monitoramento da amplificação de fragmentos através da detecção de fluorescência emitida por moléculas que se ligam às duplas fitas de ácidos nucléicos recém sintetizados na PCR. As reações foram realizadas com três repetições mecânicas, ou seja, em triplicata, e três repetições biológicas.

Nesse estudo foi utilizado o reagente SYBRGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems),

o qual contém todos os reagentes necessários para uma PCR e também a molécula que emite energia quando se intercala na dupla fita de DNA, além dos oligonucleotídeos específicos para as ampliações dos genes de interesse e do gene de expressão constitutiva utilizado como controle endógeno nas análises.

A quantificação relativa de mudanças de expressão gênica por RT-qPCR requer algumas equações e considerações que devem ser testadas. Os dados obtidos na qPCRs foram analisados de uma maneira relativa utilizando a metodologia do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Esse método de análise apresenta os resultados em relação ao ΔCt de um gene “normalizador”.

4.4.4 Eficiências das reações e validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Os oligonucleotídeos utilizados em análises de qPCR devem apresentar eficiências de amplificação semelhantes e próximas de 100%, permitindo assim a duplicação das moléculas a cada ciclo de reação. A seguinte fórmula permite a obtenção da eficiência de amplificação de um oligonucleotídeo: $E = 10^{(-1/\text{slope})}$.

As curvas para os cálculos das eficiências de amplificação (curva padrão) dos *primers* utilizados nesse estudo foram feitas utilizando-se três concentrações conhecidas de cDNA (20ng, 2ng, 0,2ng). A plotagem dos valores de Ct *versus* o log das diluições de cDNA resultam em uma reta. Para cada oligonucleotídeo foi construída uma reta e obtido um valor de inclinação (*slope*). (Figura 4). Os três oligonucleotídeos analisados apresentaram valores de eficiência de amplificação próximos a 95%.

Para que o método de análise do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ seja válido é necessário que os oligonucleotídeos utilizados apresentem eficiências de amplificação aproximadamente iguais em diferentes concentrações de cDNA (Livak e Schmittgen, 2001). A metodologia utilizada para essa

verificação foi a seguinte: em um gráfico de dispersão foram plotados os valores de ΔCt variando em diferentes logaritmos das diluições de cDNA. A reta obtida para os pontos deve apresentar um valor de inclinação próximo de zero. Os *amplicons* analisados nesse estudo apresentaram uma relação satisfatória para a utilização da metodologia do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Figura 5).

4.4.5 Condições de qPCR e expressão dos *operons*

Os oligonucleotídeos usados nas análises (*xcsNqPCR F e R*, e *xpsDqPCR F e R*) (Tabela. 2) amplificam fragmentos internos dos últimos genes dos *operons xcs* e *xps* de *Xac*, respectivamente. Cada reação foi realizada em mistura de 25 μ l (volume total) em placa de “reação óptica” de 96 células (Applied Biosystems). Em cada célula foram adicionado 50% de mistura de “SYBR green” (Applied Biosystems), 12,5 pmoles de cada um dos dois oligonucleotídeos, e 40 ng de amostra de cDNA. As reações foram realizadas no termociclador “ABI Prism 7000” (ABI) nas seguintes condições: 50 °C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. Os dados foram analisados pelo programa “Sequence Detector System” (Applied Biosystems) (Figura 6). O gene *lrp* (*leucine-responder protein*) foi utilizado como “controle endógeno” (Cubero e Graham, 2003).

Ao final de todas as reações foi adicionado um passo de desnaturação térmica gradual dos produtos de amplificação, ou curva de dissociação (Figura 7). Dessa maneira, à medida que a temperatura aumenta, as moléculas dupla-fita vão se desnaturando e liberando as moléculas de SYBRGreen, que por sua vez, deixam de emitir fluorescência. Esses resultados são convertidos em gráfico no qual é possível detectar a presença de um ou mais picos. Um pico representa um único produto de amplificação, já que cada tamanho de *amplicom* apresenta uma temperatura específica de desnaturação. A presença de mais de um pico indica a amplificação de produtos

inespecíficos, o que conduziria a erro de interpretação dos resultados.

A expressão dos genes estudados foi analisada e normalizada em relação à expressão de um gene endógeno, ou de expressão constitutiva, no caso o gene *lrp*. A metodologia empregada para a análise dos dados foi a $\Delta\Delta Ct$. Por esse método a expressão relativa (RQ) é dada pela equação $E^{-\Delta\Delta Ct}$, onde E é igual a 1 mais a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos. O $\Delta\Delta Ct$ se refere ao ΔCt do gene alvo menos o ΔCt do gene calibrador. Por sua vez, ΔCt se refere à relação dos valores de Ct do gene alvo e do gene endógeno (Ct do gene alvo – Ct do gene endógeno). Em nossas análises o ΔCt do gene calibrador obteve o valor zero, já que nosso gene endógeno também foi considerado como gene calibrador. O valor de E considerado em nossas análises foi 1,95, já que as eficiências de amplificação dos oligonucleotídeos foram aproximadamente 95%.

Os resultados foram expressos como médias das três repetições biológicas \pm desvio padrão das médias. As comparações os tratamentos foram analisadas pelo teste t de médias com significância $p < 0,05$.

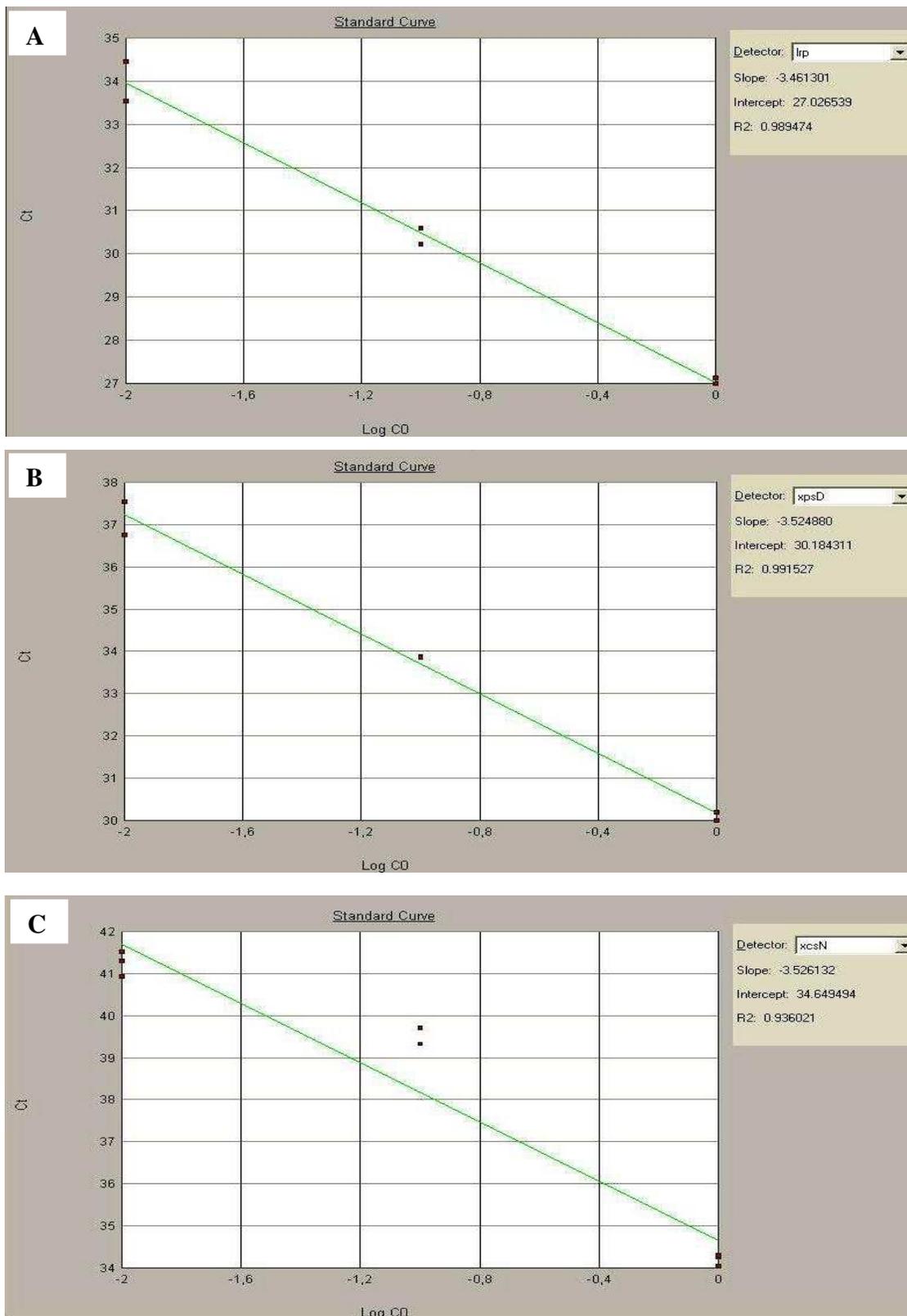


Figura 4. Análises das eficiências de amplificações dos oligonucleotídeos. Curvas padrão dos

oligonucleotídeos lrpqPCR (A), xpsDqPCR (B) e xcsNqPCR (C).

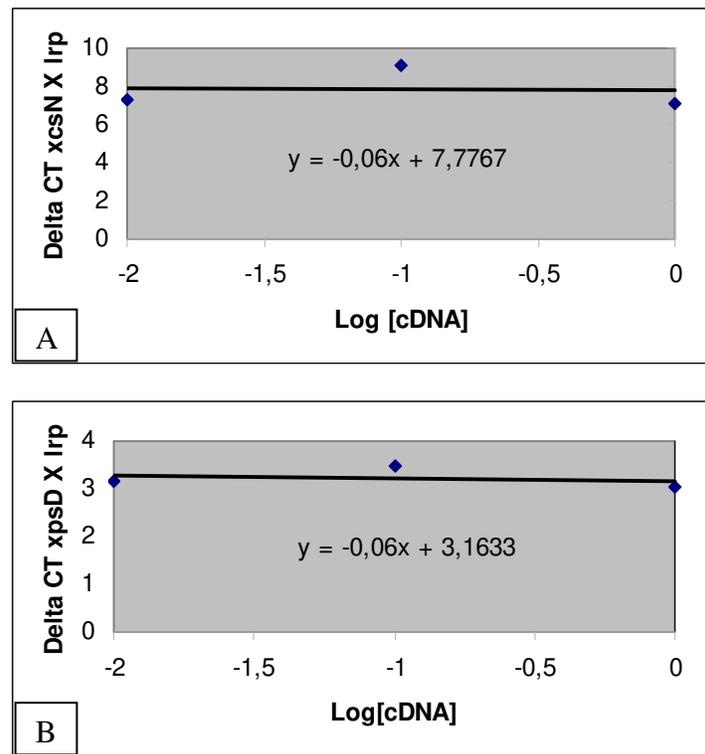


Figura 5. Validação do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. ΔCt versus diluições de cDNA para *xcsN* (A) e *xpsD* (B) com respectivos valores de inclinação.

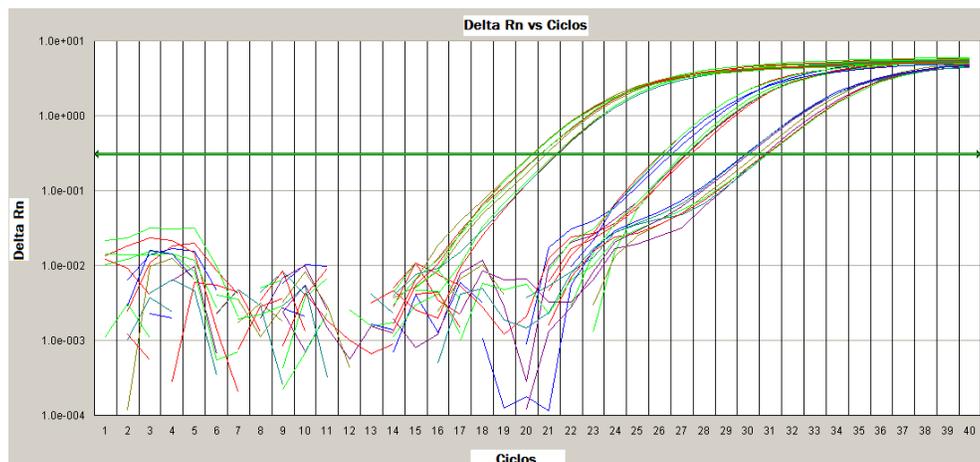


Figura 6. Exemplo de curva de amplificação das qPCR com os oligonucleotídeos lrpqPCR, xcsNqPCR e xpsDqPCR.

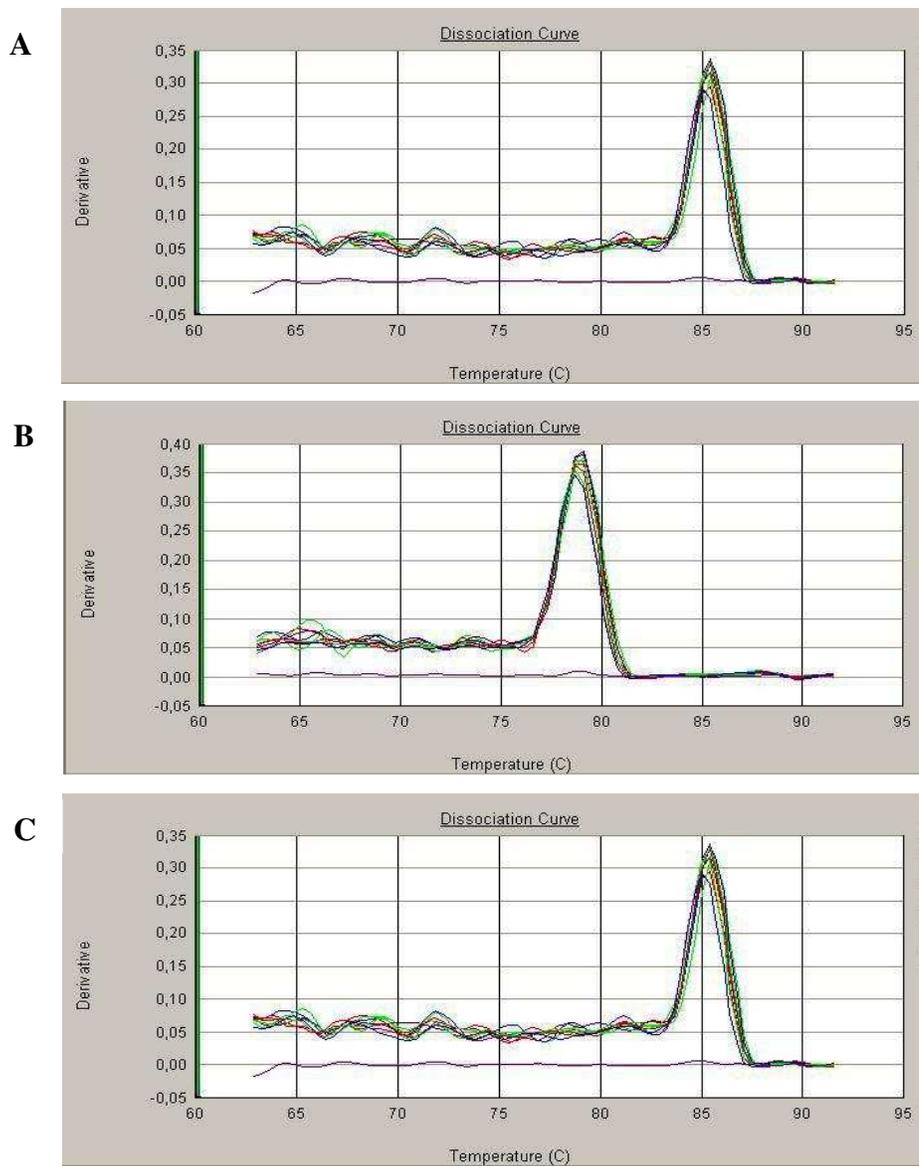


Figura 7. Curvas de dissociação obtidas nas qPCR utilizando os oligonucleotídeos lrpqPCR (A), xpsDqPCR (B) e xcsNqPCR (C).

5 RESULTADOS

5.1 Mutagênese

5.1.1 Amplificação e clonagem dos fragmentos

Visando causar mutações através de recombinações homólogas simples (Figura 8), sequências iniciadoras foram desenhadas para amplificar fragmentos internos dos genes *xcsD* e *xpsD*. Os tamanhos dos produtos de amplificação gerados nas PCR utilizando essas sequências iniciadoras foram 428 pb, correspondente ao fragmento interno do gene *xcsD*, e 582 pb correspondente ao fragmento interno do gene *xpsD* (Figura 9).

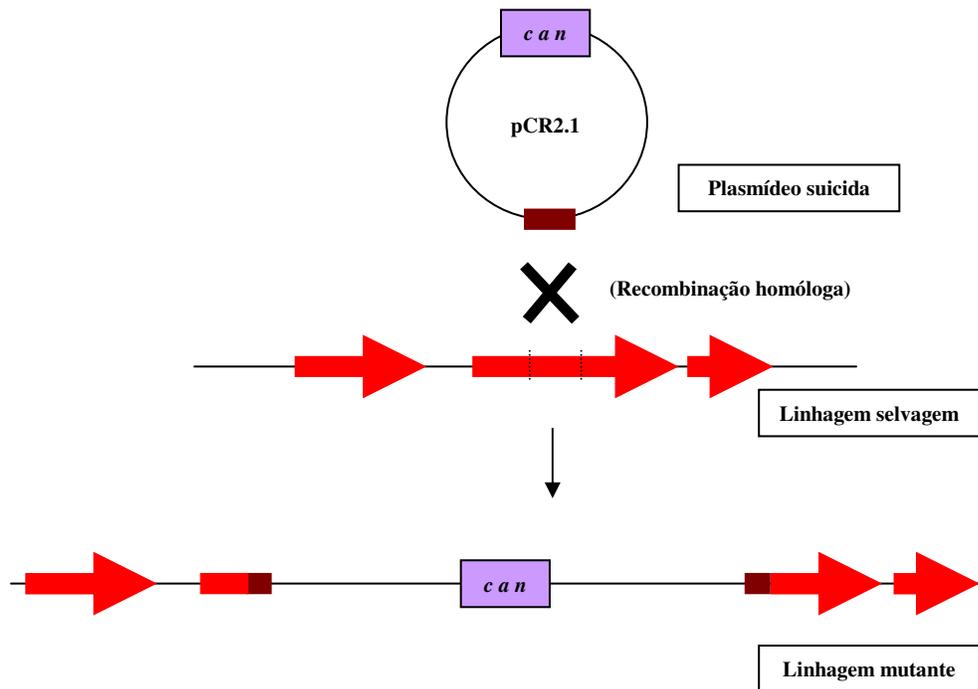


Figura 8: Representação do evento de recombinação homóloga simples. A integração do plasmídeo suicida na região interna do gene alvo causa a mutação e confere resistência ao antibiótico canamicina.

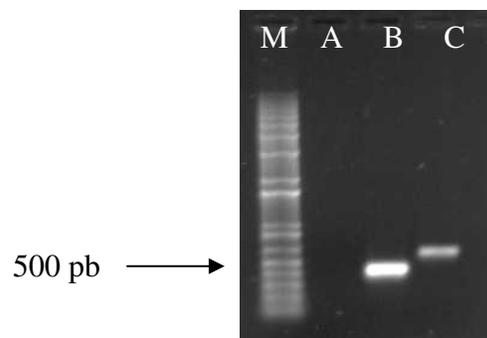


Figura 9. Gel de agarose 0,8 % submetido à eletroforese. M - marcador molecular 1 Kb Plus, A - reação sem DNA molde, B - produto de amplificação de fragmento do gene XAC0695 (*xcsD*), C - produto de amplificação de fragmento do gene XAC3534 (*xpsD*).

Esses produtos de amplificação foram clonados em plasmídeo que não se replica em *Xac* (pCR2.1TOPO). A confirmação da clonagem desses fragmentos foi realizada por sequenciamento com oligonucleotídeos M13 e através da liberação dos fragmentos por digestão com a enzima *EcoRI* e posterior eletroforese em gel de agarose (Figura 10).

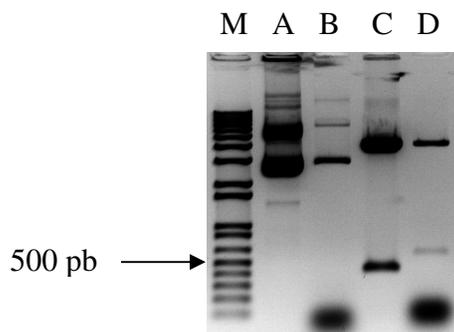


Figura 10. Gel de agarose 0,8 % submetido à eletroforese. M - marcador molecular 1Kb Plus, A - clonagem do produto de amplificação do gene *xcsD* no vetor pCR2.1 TOPO, B - clonagem do produto de amplificação do gene *xpsD* no vetor pCR2.1 TOPO, C - digestão da clonagem A (pCR2.1 TOPO + *xcsD*) com *EcoRI* e D - Digestão da clonagem B (pCR2.1 TOPO + *xpsD*) com *EcoRI*.

Com o objetivo de produzir linhagem bacteriana com duas mutações no genoma foi necessária a clonagem de nova marca de seleção. Oligonucleotídeos para a amplificação do gene de resistência a gentamicina foram utilizados em PCR, gerando fragmento de 855 pb (Figura 11). Esse fragmento foi primeiramente clonado no vetor pGEM-T, gerando a construção pGEM-TGENTA, a qual foi confirmada por digestão com as enzimas *Pst*I e *Sph*I (Figura 12).

A digestão dessa construção com as enzimas *Pst*I e *Sph*I liberou o fragmento contendo o gene de resistência a gentamicina, o qual foi clonado no vetor pK18mobGUSII, também digerido com essas enzimas. A confirmação da clonagem do fragmento nesse vetor foi realizada por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Figura 13), e o fragmento gerado foi clonado na construção pCR2.1 TOPO*xcs*D, também digerida com essas enzimas.

Antes de ser transformada em células competentes do mutante 306ΔTn5*xps*D (Baptista, 2006), essa construção foi confirmada por digestão para liberação do fragmento contendo o gene de resistência a gentamicina, utilizando as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Figura 14), e sequenciamento.

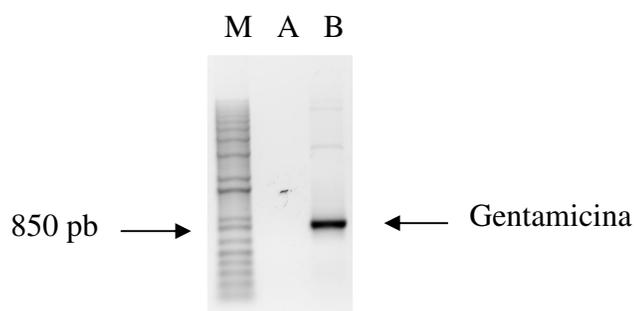


Figura 11. Gel de agarose 0,8 % submetido à eletroforese. M - marcador molecular 1kb Plus, A - reação sem DNA molde, B - produto de amplificação do gene para resistência a gentamicina

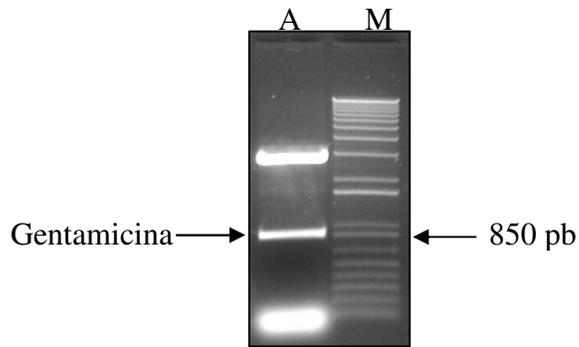


Figura 12. Gel de agarose 0,8 % submetido à eletroforese. M - marcador molecular 1Kb Plus, A - digestão da construção pGEM-T + gentamicina com *PstI* e *SphI*.

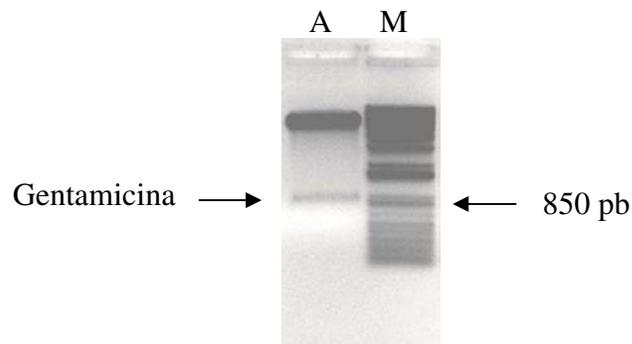


Figura 13. Gel de agarose 0,8 % submetido à eletroforese. M - marcador molecular 1Kb Plus, A - digestão da clonagem pK18mobGUSII + gentamicina com *BamHI* e *HindIII*.

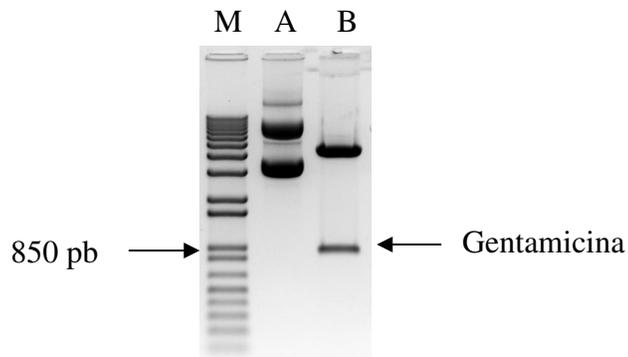


Figura 14. Gel de agarose 0,8 % submetido à eletroforese. M - marcador molecular 1Kb Plus, A - clonagem do fragmento contendo o gene para resistência a gentamicina na construção pCR 2.1-TOPO α csD, B - digestão da clonagem A (pCR 2.1-TOPO α csD + gentamicina) com *BamHI* e *HindIII*.

5.1.2 Transformação de *Xac* e teste em planta hospedeira

Os plasmídeos recombinantes foram transferidos por eletroporação para células competentes de *Xac* selvagem (mutantes simples) e 306 Δ Tn5*xpsD* (mutante duplo). Os transformantes foram selecionados em meio de cultura NBY sólido contendo os devidos antibióticos. Amostras de colônias foram isoladas e passaram por sucessivas repicagens em meio de cultura, acrescido de antibiótico, com o intuito de verificar a estabilidade da transformação, ou seja, verificar se estas são realmente permanentes (não-transitória). As confirmações de integração dos plasmídeos no genoma de *Xac* foram realizadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos para os genes de resistência aos antibióticos canamicina (mutantes simples) e gentamicina (mutante duplo), os quais apresentaram os tamanhos esperados de 422pb e 855pb, respectivamente (Figura 15).

Com esse mesmo intuito, foram conduzidos experimentos de *Southern blot* utilizando como sondas os produtos de amplificação dos genes de resistência aos antibióticos canamicina e gentamicina marcados com digoxigenina. As marcações únicas da sonda de canamicina no DNA dos mutantes simples e a visualização dos tamanhos esperados para as digestões com *Bam*HI (aproximadamente 10,5 kb para mutação em *xcsD* e 11 kb para *xpsD*) e *Hind*III (aproximadamente 24 kb para mutação em *xcsD* e 40 kb para *xpsD*) confirmaram a ocorrência de eventos únicos de recombinação homóloga simples no genoma dessas linhagens. Esses eventos causaram a integração do plasmídeo no genoma e conseqüente mutação dos genes de interesse, obtendo-se os mutantes 306 Δ *xcsD* e 306 Δ *xpsD*.

As duas marcações no DNA do mutante duplo digerido com *Hind*III, devido às hibridações com as sondas para os genes de resistência a canamicina (24 kb) e gentamicina (9 kb), e a visualização dos tamanhos esperados desses fragmentos, confirmaram a integração do

plasmídeo por recombinação homóloga simples, e conseqüente mutação de *xcsD* no genoma do mutante 306 Δ Tn5*xpsD* (Baptista, 2006), obtendo-se o mutante duplo 306 Δ *xcsDxpsD* (Figura 16).

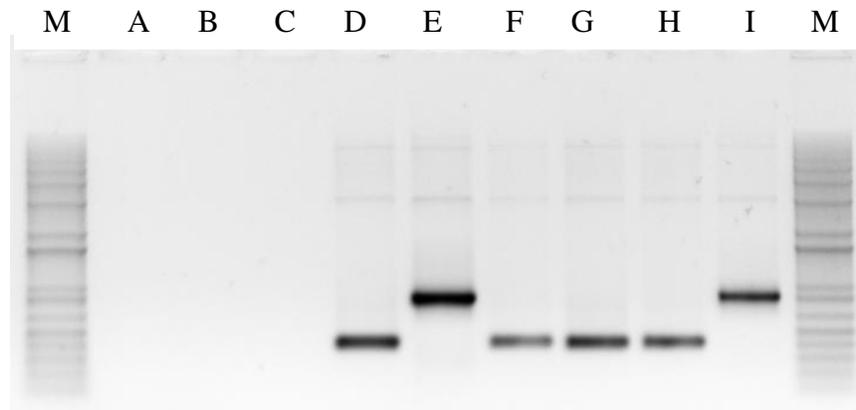


Figura 15. Gel de agarose 0,8% submetido à eletroforese. A - PCR com oligonucleotídeos para amplificação do gene de resistência a canamicina e gentamicina sem DNA molde, B - controle negativo com oligonucleotídeos para o gene de resistência a canamicina e DNA de *Xac* selvagem, C - controle negativo com oligonucleotídeos para o gene de resistência a gentamicina e DNA de *Xac* selvagem, D - controle positivo com oligonucleotídeos do gene de resistência a canamicina e DNA de pCR 2.1-TOPO, E - controle positivo com oligonucleotídeos do gene de resistência a gentamicina e DNA de pUFR047, F – produto de amplificação com oligonucleotídeos do gene de resistência a canamicina e DNA do mutante 306 Δ *xcsD*, G - produto de amplificação com oligonucleotídeos do gene de resistência a canamicina e DNA do mutante 306 Δ *xpsD*, H - produto de amplificação com oligonucleotídeos do gene de resistência a canamicina e DNA do mutante 306 Δ *xcsDxpsD*, I - de amplificação com oligonucleotídeos do gene de resistência a gentamicina e DNA do mutante 306 Δ *xcsDxpsD*.



Figura 16. *Southern blot* utilizando sondas para os genes de resistência a canamicina e gentamicina. A - Controle negativo (DNA de *Xac* selvagem digerido com *Bam*HI), B - DNA de 306 Δ *xcs*D digerido com *Bam*HI, C - DNA de 306 Δ *xps*D digerido com *Bam*HI, D - DNA de 306 Δ *xcs*D Δ *xps*D digerido com *Bam*HI, E - Controle negativo (DNA de *Xac* selvagem digerido com *Hind*III), F - DNA de 306 Δ *xcs*D digerido com *Hind*III, G - DNA de 306 Δ *xps*D digerido com *Hind*III, H - DNA de 306 Δ *xcs*D Δ *xps*D digerido com *Hind*III, I - Controle positivo para o gene de resistência a canamicina (PCR do gene de resistência a canamicina), J - Controle positivo para o gene de resistência a gentamicina (PCR do gene de resistência a gentamicina).

Após a confirmação das mutações nos genes de interesse, suspensões de células dos mutantes foram inoculadas em plantas hospedeiras por espalhamento e infiltração. As cinéticas de infecção foram acompanhadas até os 30 dias após inoculação (DAI) (Figura 17A e 17B)

Nas variedades analisadas, e com esses dois métodos de inoculação, foram constatadas

diferenças sintomáticas entre os mutantes e a bactéria selvagem. As alterações sintomáticas causadas pelo mutante $306\Delta xcsD$ inoculado por infiltração foram muito sutis e percebidas apenas no estágio inicial da infecção (3 DAI), verificadas por uma coloração distinta (mais escurecida) e um menor nível de hiperplasia. Quando inoculado por espalhamento em folha, esse mutante apresentou uma considerável redução no número de lesões observadas aos 30 DAI.

A manifestação dos sintomas de cancro cítrico no mutante $306\Delta xpsD$ apresentou diferença mais evidente, quando comparado com a bactéria selvagem. Esse também apresentou coloração distinta na fase inicial da doença e retardamento na indução de necrose do tecido foliar. Quando inoculado pela técnica de espalhamento, esse mutante, comparado com a bactéria selvagem, também apresentou reduzido número de pústulas aos 30 DAI, porém, um maior número de lesões quando comparado com o mutante $306\Delta xcsD$.

A linhagem duplo mutante $306\Delta xcsDxpsD$, quando inoculado por infiltração, apresentou sintomatologia muito semelhante ao mutante $306\Delta xpsD$ na fase inicial, porém, em estágio avançado, manifestou sintomas distintos das outras duas linhagens mutantes e da linhagem selvagem. Quando inoculada por espalhamento, $306\Delta xcsDxpsD$ também apresentou redução no número de lesões aos 30 DAI, de maneira semelhante à apresentada pelo mutante $306\Delta xcsD$.

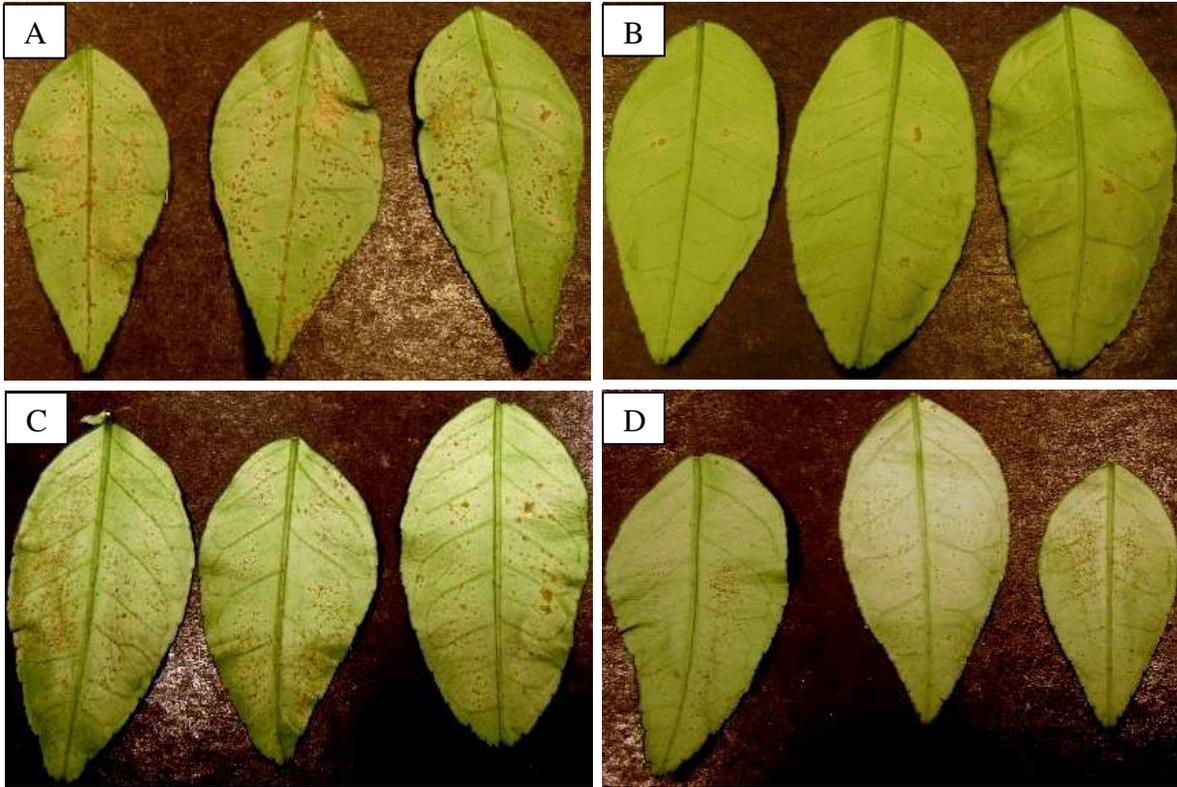


Figura 17A. Folhas de laranjeira da variedade Pomelo inoculadas com linhagens de *Xac* selvagem (A), $306\Delta xcsD$ (B), $306\Delta xpsD$ (C) e $306\Delta xcsDxpsD$ (D) por espalhamento com auxílio de cotonetes e fotografadas aos 21 DAI.

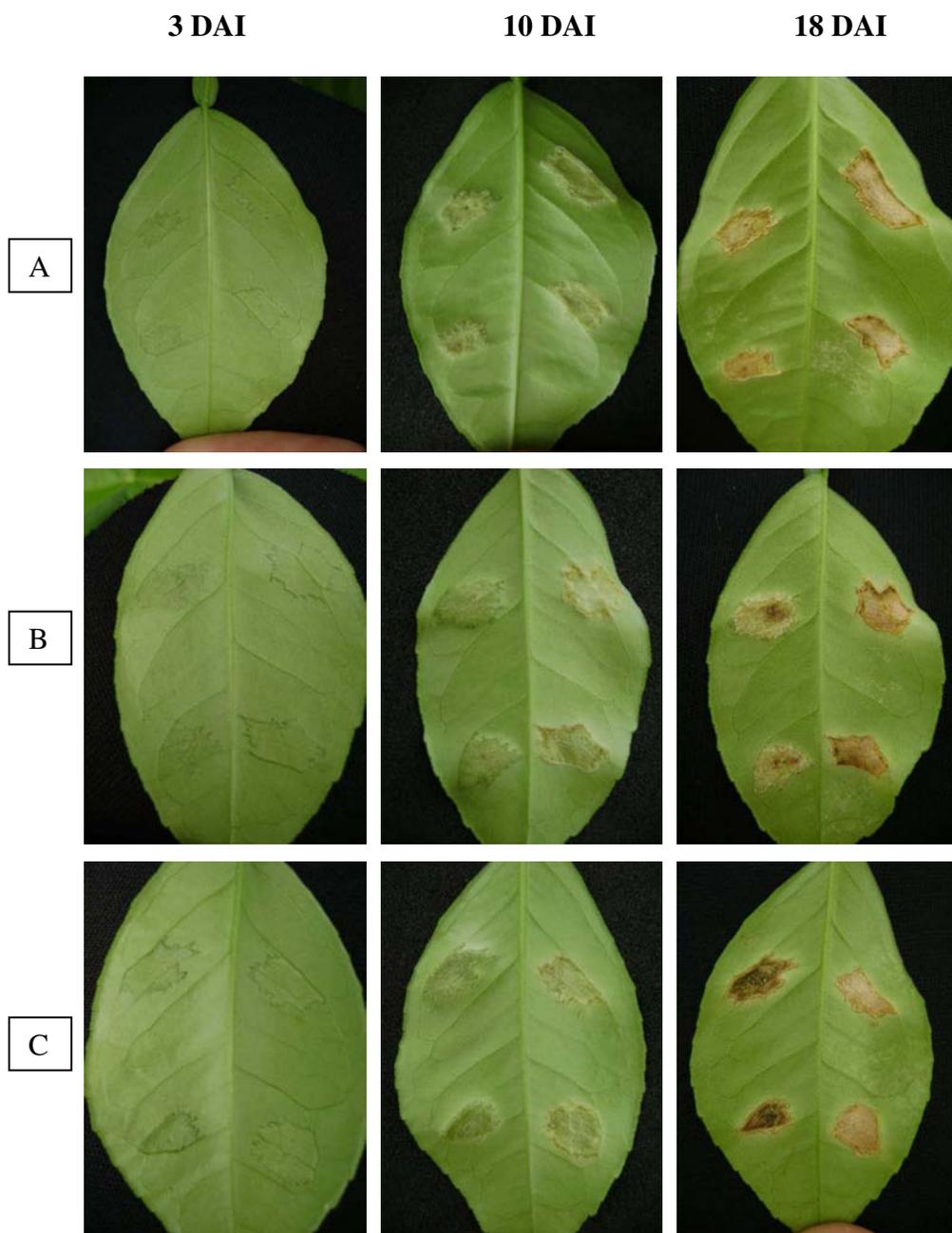


Figura 17B. Linhagens 306 Δ *xcsD* (A), 306 Δ *xpsD* (B), 306 Δ *xcsDxpsD* (C) (lado esquerdo da nervura central) e selvagem (lado direito da nervura central) inoculadas em folhas de laranjeira da variedade Pêra por infiltração, e fotografadas com 3, 10 e 18 DAI.

5.1.3 Curvas de crescimento

Visando analisar a capacidade de crescimento dos mutantes em meio complexo rico (NBY), ideal para o crescimento de *Xac* selvagem, foi montado experimento onde se monitorou indiretamente, através de absorbância a 600_{nm}, o crescimento das diferentes linhagens. Os resultados representados no gráfico indicaram que, apesar de não haver alteração no perfil de crescimento dos mutantes na fase exponencial, na fase estacionária há um declive precoce dos mutantes 306 Δ *xpsD* e 306 Δ *xcsDxpsD* em relação ao mutante 306 Δ *xcsD* e a linhagem selvagem (Figura 18).

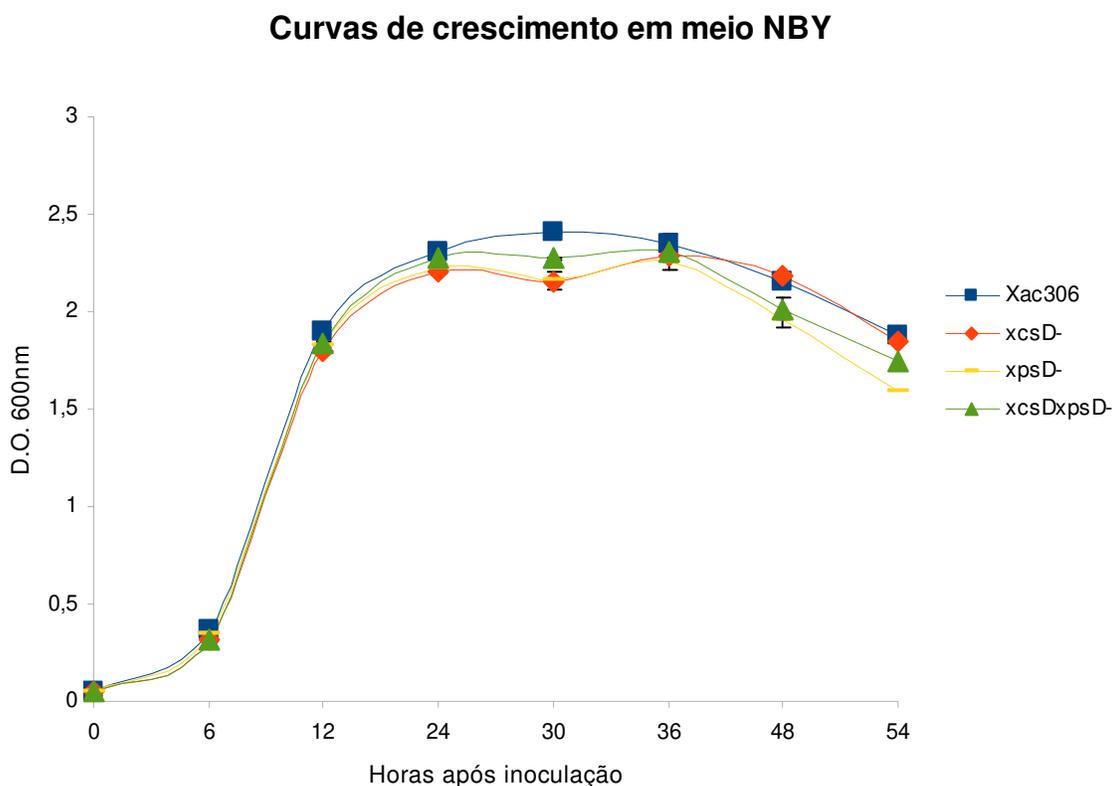


Figura 18. Curvas de crescimento em meio de cultura NBY das linhagens bacterianas selvagem (*Xac306*), 306 Δ *xcsD* (*xcsD*-), 306 Δ *xpsD* (*xpsD*-) e 306 Δ *xcsDxpsD* (*xcsDxpsD*-).

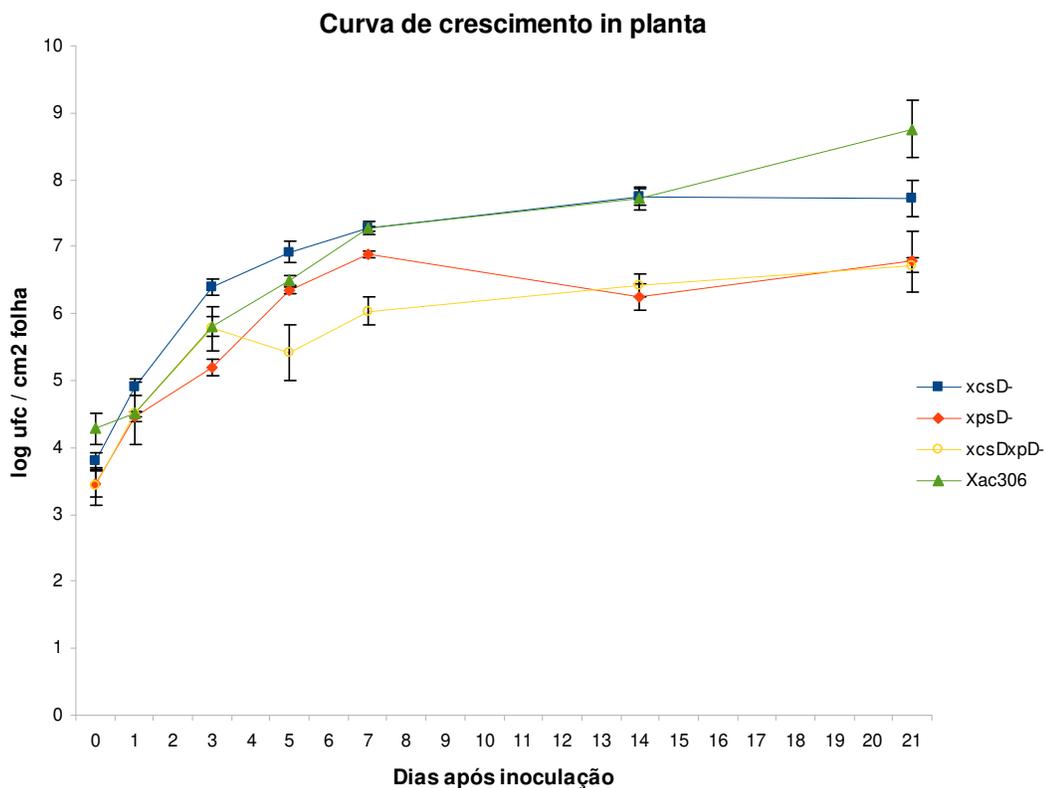


Figura 19. Curva de crescimento *in planta* das linhagens bacterianas selvagem (Xac306), $306\Delta xcsD$ (xcsD-), $306\Delta xpsD$ (xpsD-) e $306\Delta xcsDxpsD$ (xcsDxpsD-). Os pontos correspondem ao log da concentração de unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado de folha nos dias 0, 1, 3, 5, 7, 14 e 21 após inoculação em planta hospedeira.

Com o objetivo de quantificar as alterações sintomáticas causadas pelos mtantes em planta hospedeira, foram conduzidos experimentos que monitoraram a cinética de infecção das diferentes linhagens. Os resultados obtidos foram utilizados na construção de curvas de crescimento *in planta* (Figura 19).

Dentre todas as linhagens bacterianas, o mutante 306 Δ *xcsD* foi o que apresentou perfil de crescimento mais semelhante ao da linhagem selvagem. Na fase exponencial de crescimento, esse mutante se mostrou ligeiramente superior à bactéria selvagem, porém em fase mais tardia da infecção (21 DAI) apresentou menor número de UFC.

Foram constatadas alterações significativas na cinética de infecção das linhagens 306 Δ *xpsD* e 306 Δ *xcsDxpsD*, quando comparadas com a bactéria selvagem, verificando-se menor número de UFC na maioria dos dias analisados. A linhagem 306 Δ *xpsD*, quando comparada à linhagem 306 Δ *xcsDxpsD*, apresentou maior número de UFC no final da fase exponencial de crescimento, porém se igualaram na fase estacionária.

A quantificação temporal das bactérias infectantes mostrou claramente alteração no crescimento entre as linhagens selvagem e mutantes. Essa diferença fica mais evidente quando se compara a linhagem selvagem com 306 Δ *xpsD* e 306 Δ *xcsDxpsD*, porém menos significativa quando comparada com 306 Δ *xcsD*. Visualmente, ou qualitativamente, as diferenças foram facilmente constatadas quando se compara os sintomas causados pelas diferentes linhagens bacterianas nos discos foliares utilizados para quantificação das bactérias no último dia da curva de crescimento. Os discos foliares foram fotografados com o auxílio de lupa aos 21 DAI e evidenciam, pela menor quantidade de lesões de cancro cítrico, a diminuição da capacidade de desenvolvimento dos mutantes em folhas de planta hospedeira (Figura 20).

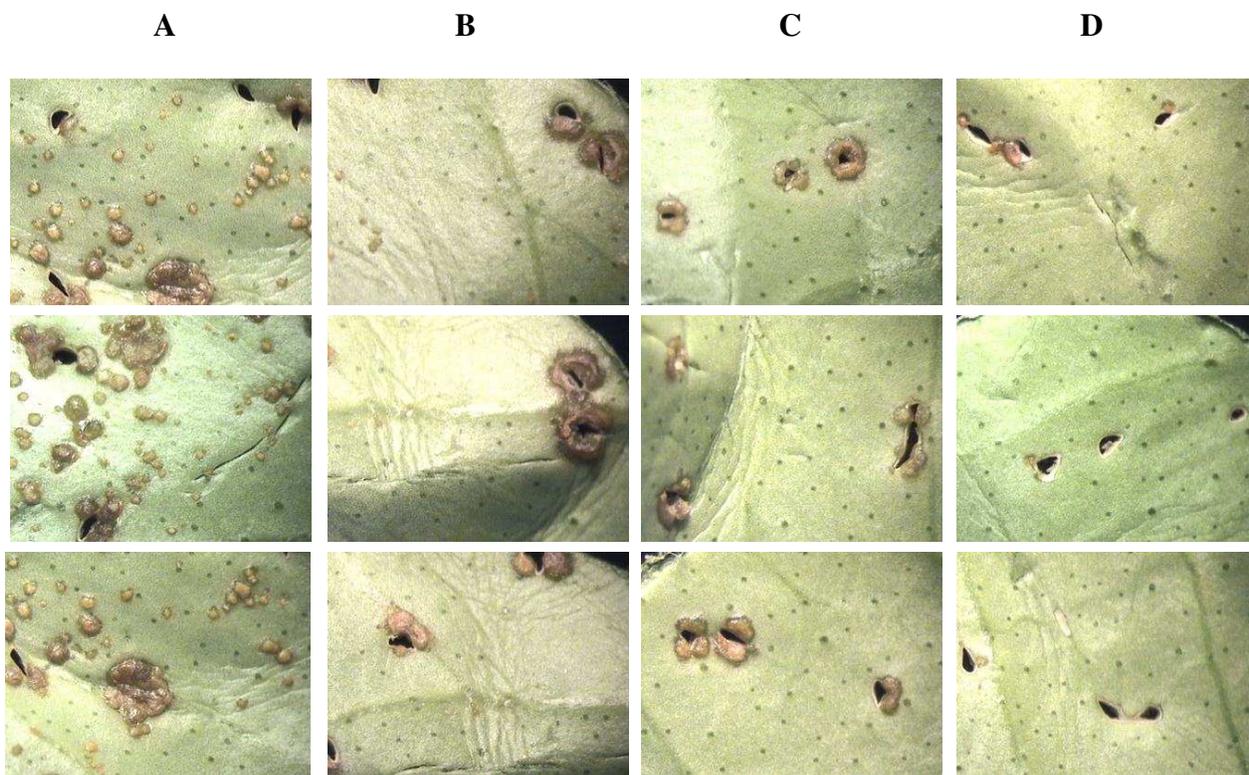


Figura 20. Sintomas de cancro cítrico em discos foliares (3 repetições) utilizados para curva de crescimento *in planta* aos 21 DAI. *Xac* 306 selvagem (A), $306\Delta xcsD$ (B), $306\Delta xpsD$ (C), $306\Delta xcsDxpsD$ (D).

5.1.4 Formação de biofilme

5.1.4.1 Fixação em poliestireno

Na figura 20 estão representados os resultados de adesão em superfície abiótica. Pode-se constatar que a linhagem selvagem apresentou os maiores índices de adesão nos três tempos analisados, evidenciando a menor capacidade de adesão dos mutantes em superfície de poliestireno. Os três mutantes analisados, quando comparados, se comportaram de maneira

semelhante na capacidade de adesão ao poliestireno.

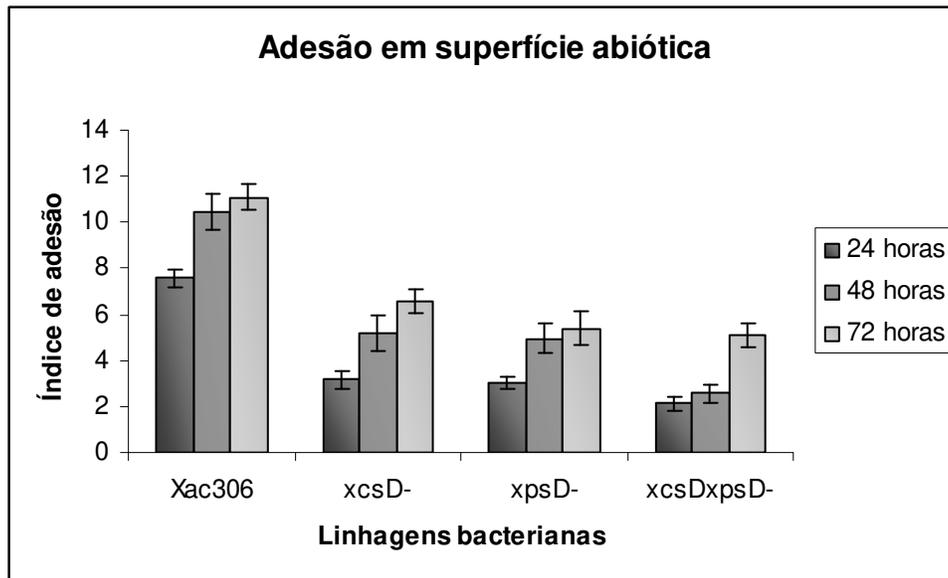


Figura 21. Índice relativo de adesão em superfície abiótica. Bactéria selvagem (Xac306) e mutantes $306\Delta xcsD$ (*xcsD*-), $306\Delta xpsD$ (*xpsD*-) e $306\Delta xcsDxpsD$ (*xcsDxpsD*-) analisados em culturas estáticas de YMM, nos tempos 24, 48 e 72 horas após inoculação, através de quantificação espectrofotométrica do corante cristal violeta associado às células bacterianas aderidas ao substrato.

5.1.4.2 Microscopia confocal

Com o objetivo de analisar a funcionalidade dos *operons xcs* e *xps* na formação de biofilme, as linhagens selvagem e mutantes expressando GFP foram analisadas por microscopia confocal de varredura *laser*. O desenvolvimento do biofilme foi acompanhado até 128 horas após a inoculação em meio YMM e os resultados demonstraram evidente diferença nos biofilmes formados pelos mutantes em comparação com o formado pela linhagem selvagem.

Enquanto a linhagem selvagem com 15 horas após inoculação já apresentava base

formada de bactérias aderidas à superfície, o mais próximo disso para o mutante 306 Δ *xcsD* foi observado apenas com 52 horas após inoculação. O mutante 306 Δ *xpsD* apresentou fenótipo semelhante com 40 horas após inoculação, enquanto para a linhagem 306 Δ *xcsDxpsD* esse fenótipo não foi observado para bactérias vivas, porém quando coradas com a substância LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen), que faz com que as bactérias mortas sejam visualizadas na cor vermelha, verificou-se quantidade de bactérias aderidas a superfície apenas com 76 horas após inoculação.

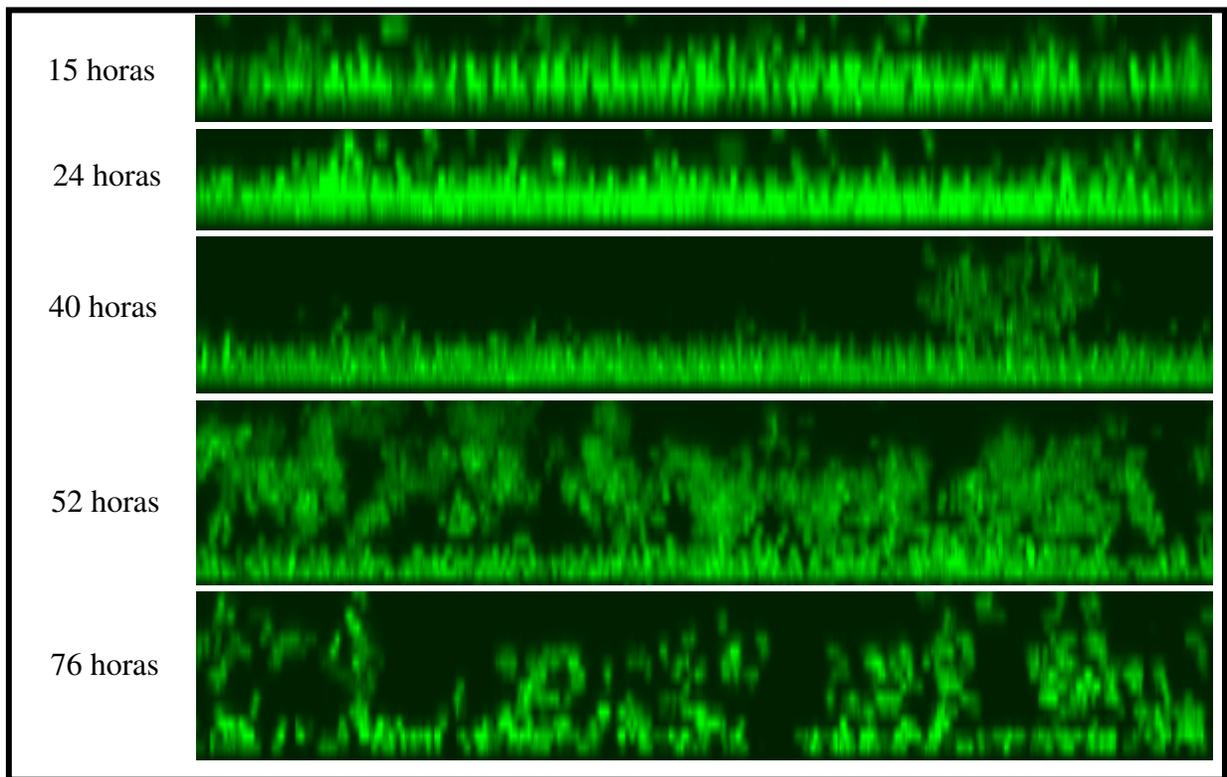
De 15 a 76 horas após a inoculação, a linhagem selvagem apresentou evolução típica na formação de biofilme estruturado. Essa formação típica, que consiste na fixação ao substrato, seguida por formação de microcolônias, que com o tempo evoluem para macrocolônias, formando uma estrutura complexa e organizada, e no final se dispersa, não foi observada para nenhuma das linhagens mutantes.

O mutante 306 Δ *xcsD* necessitou maior período para se fixar ao substrato e foi capaz de formar quantidade de microcolônias inferior às formadas pela linhagem selvagem. As microcolônias formadas não evoluíram para macrocolônias e não formaram biofilme estruturado.

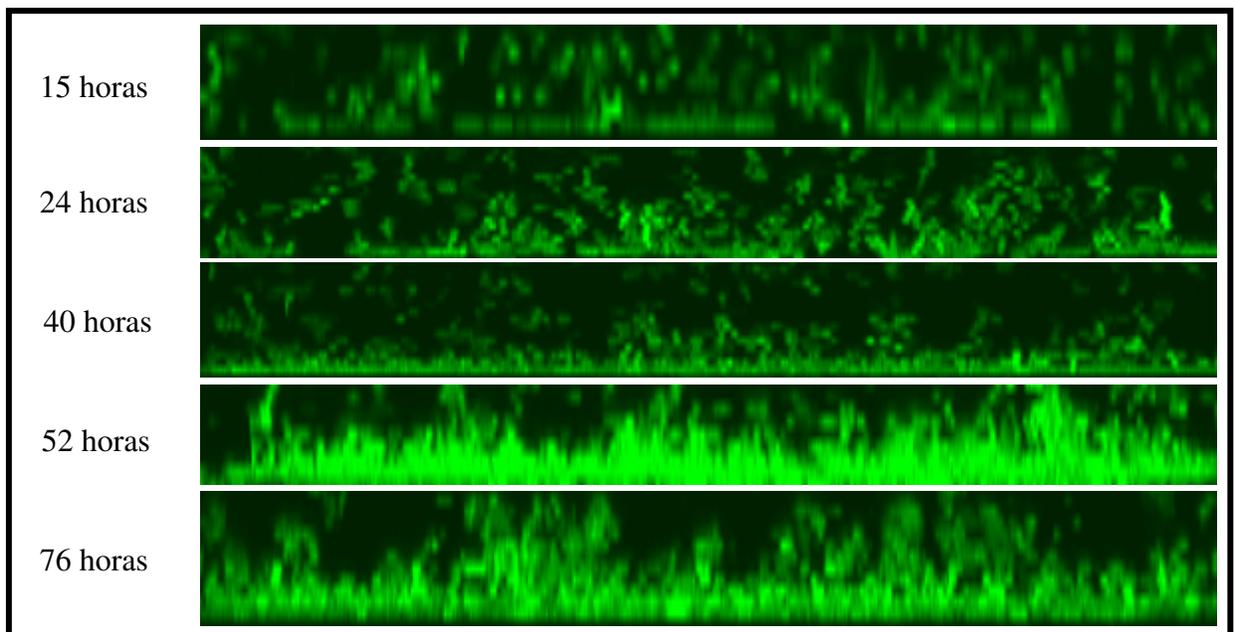
No segundo dia após as inoculações, a linhagem selvagem apresentou biofilme maduro e espesso, diferindo dos mutantes, que foram incapazes de formar biofilme estruturado. O mutante 306 Δ *xcsDxpsD* foi o que mais apresentou diferenças na formação de biofilme, sendo incapaz de se aderir à superfície e formar aglomerados bacterianos.

O mutante 306 Δ *xcsD* também não foi capaz de formar biofilme maduro e espesso como aquele formado pela linhagem selvagem e, da mesma maneira que o mutante duplo, não formou aglomerados bacterianos. O biofilme formado pelo mutante 306 Δ *xpsD* foi o que menos diferiu da bactéria selvagem, porém, apresentou espessura reduzida e menor tamanho dos aglomerados bacterianos.

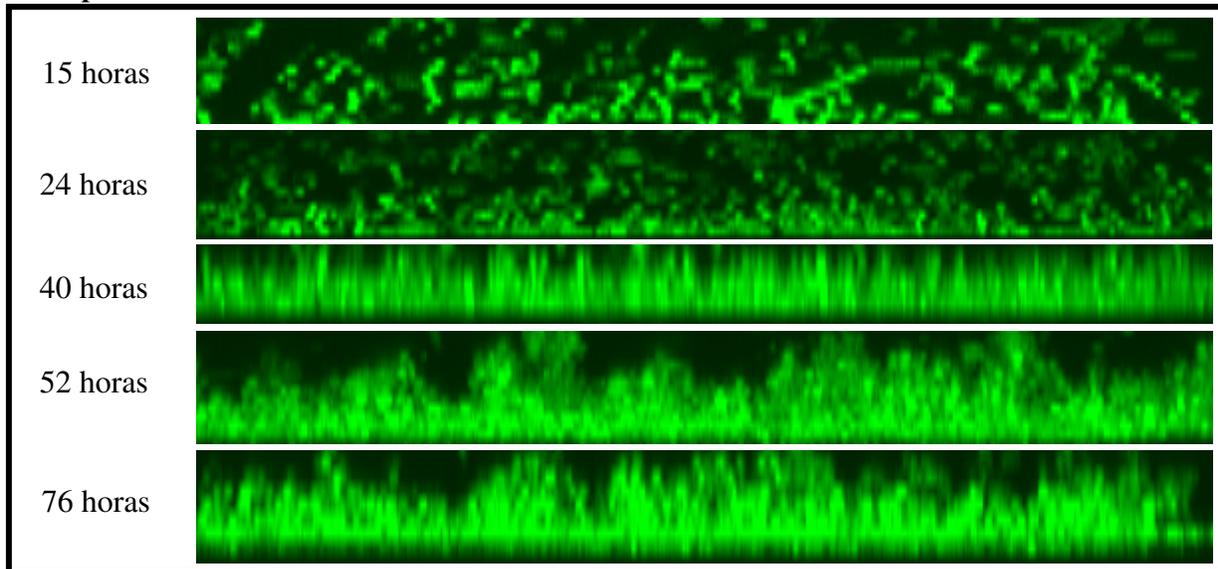
Xac 306 - GFP



306 Δ xcS D - GFP



306 Δ xpsD - GFP



306 Δ xcsDxpsD - GFP

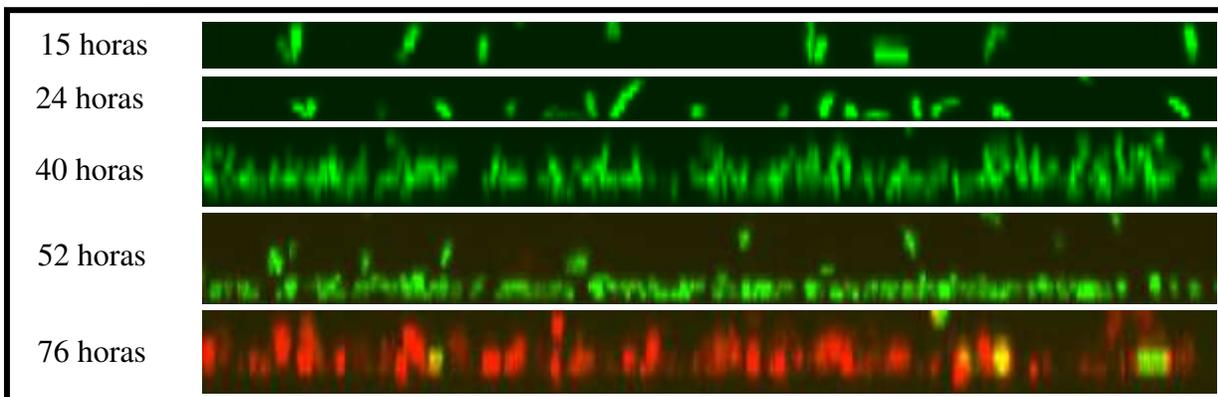


Figura 22. Linhagens bacterianas (selvagem e mutantes 306 Δ xcsD, 306 Δ xpsD e 306 Δ xcsDxpsD) expressando a proteína GFP, analisadas por microscopia confocal de varredura *laser* nos tempos 15, 24, 40, 52 e 76 horas após inoculação em cultivos estáticos de meio YMM suplementado com 1 % de glicose. As imagens são projeções do plano x – z, representando uma vista lateral das câmaras de crescimento.

5.1.5 Produção de goma xantana

Ensaio de precipitação e quantificação relativa de goma xantana produzida pelas linhagens bacterianas em estudo foram realizados em cultivos em fase estacionária de crescimento em meio acrescido de 1% de glicose e agitação ininterrupta. Os resultados apresentaram aumento significativo na quantidade relativa de goma presente nos cultivos das linhagens 306 Δ xpsD e 306 Δ xcsDxpsD em comparação à linhagem selvagem. A linhagem 306 Δ xcsD não apresentou diferença significativa em relação à linhagem selvagem. Os resultados foram analisados pelo teste t de médias ($P < 0,05$) com o programa Assisat.

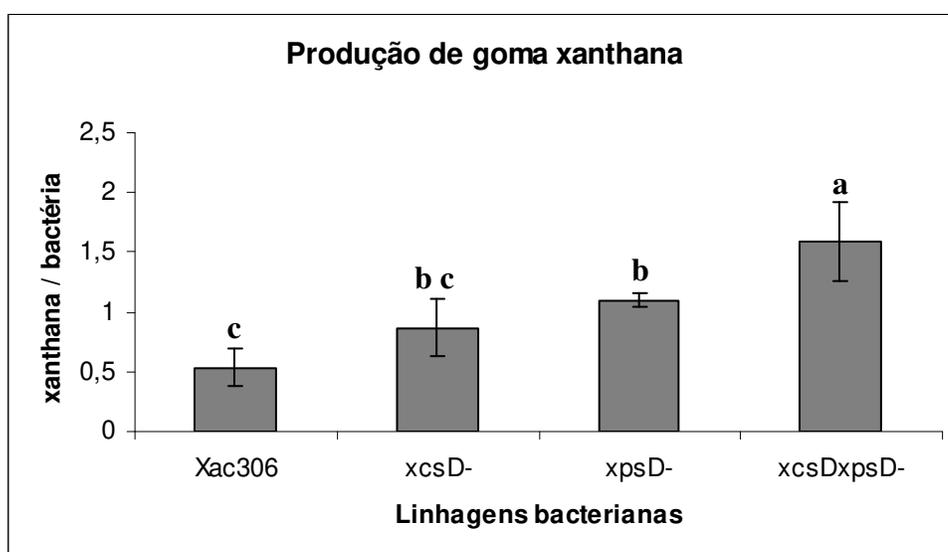


Figura 23. Produção relativa de goma xantana das linhagens bacterianas selvagem (*Xac306*), 306 Δ xcsD (*xcsD-*), 306 Δ xpsD (*xpsD-*) e 306 Δ xcsDxpsD (*xcsDxpsD-*). Peso de matéria seca de goma xantana em relação ao peso de matéria seca de células. Resultados analisados pelo teste t de médias, $P < 0,05$, com respectivos desvios padrão das médias, representados por barras.

5.1.6 Ensaio de degradação de compostos em placa

Com o intuito de analisar o efeito das mutações sobre a secreção de enzimas hidrolíticas, as linhagens foram avaliadas para degradação em placa de carboximetilcelulose (CMC), amido e proteína (Figura 24).

O perfil de degradação do mutante $306\Delta xcsD$ foi igual ao apresentado pela linhagem selvagem em todos os compostos analisados. Por outro lado, embora as linhagens $306\Delta xpsD$ e $306\Delta xcsDxpsD$ tenham se comportado de maneira muito semelhante entre si, apresentaram significativa redução nos diâmetros dos halos de degradação em amido, CMC e proteína, quando comparados à linhagem selvagem. As comparações entre os índices enzimáticos foram realizadas com o teste t de médias a 0,05% de significância e os resultados plotados em gráficos de barras junto com os respectivos desvios padrão das médias (Figura 24).

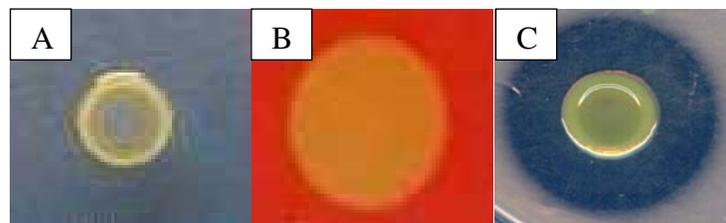


Figura 24. Exemplo de formação de halos de degradação. (A) colônia de *Xac*. (B) halo de degradação em meio de cultura sólido contendo carboximetilcelulose, lavada e corada com solução de vermelho do Congo. (C) colônia de *Xac* e halo de degradação em meio de cultura sólido contendo proteína de leite.

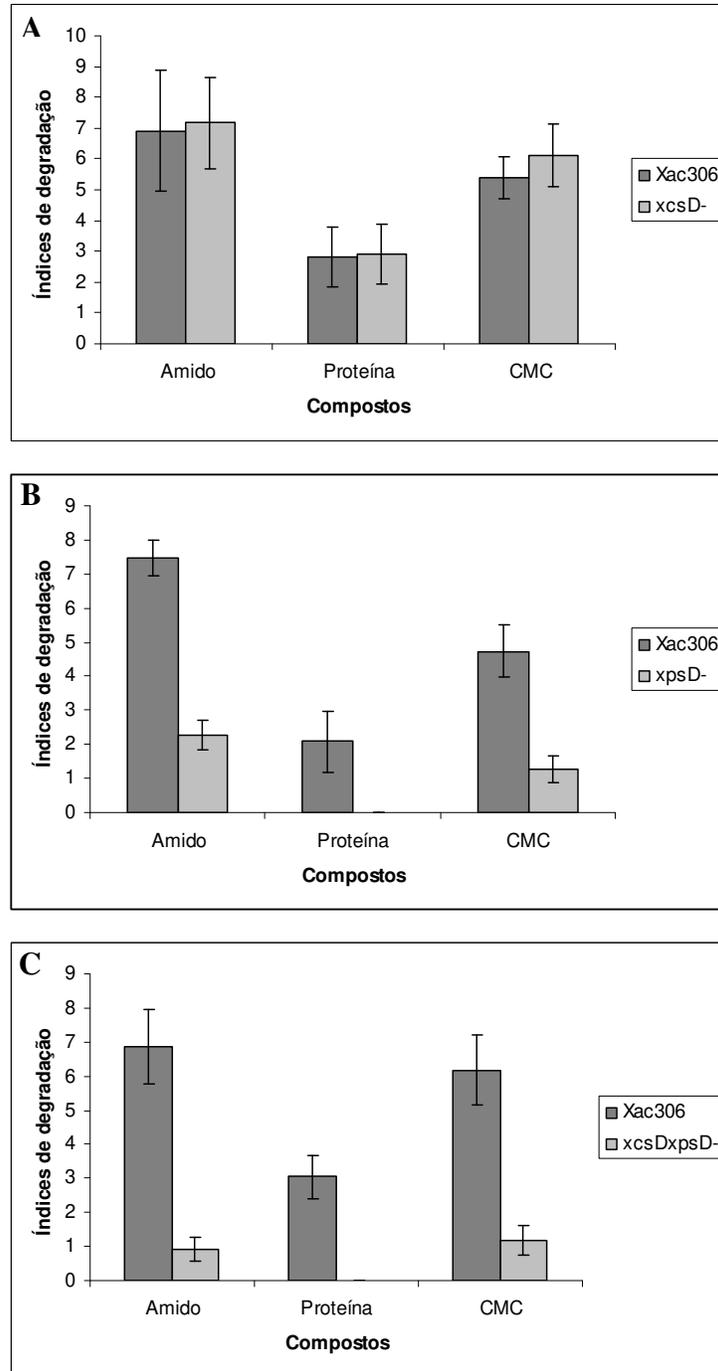


Figura 25. Índices de degradação de amido, proteína e CMC. A – bactéria selvagem (*Xac306*) e *306ΔxcsD* (*xcsD*-); B – bactéria selvagem (*Xac306*) e *306ΔxpsD* (*xpsD*-), C – bactéria selvagem (*Xac306*) e *306ΔxcsDxpsD* (*xcsDxpsD*-). Erro padrão da média representado por linha vertical no centro das barras.

5.2 Análise de expressão gênica

5.2.1 Validação das seqüências amplificadas

As validações dos fragmentos amplificados correspondentes aos últimos genes de cada agrupamento gênico do SSTII de *Xac* - XAC3534 (*xpsD*) e XAC0705 (*xcsN*) - e também do *amplicon* para o gene *lrp* (controle endógeno) foram feitas em PCR comum. Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (Figura 26), confirmando o tamanho aproximado das amplificações. O sequenciamento dos produtos de amplificação confirmou a identidade das seqüências.

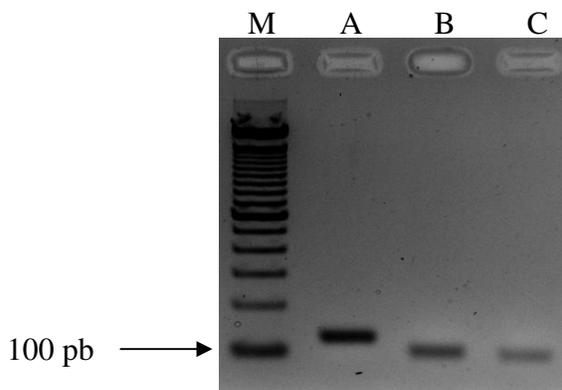


Figura 26. Gel de agarose 2% submetido à eletroforese. M – marcador molecular 1Kb Plus; A - produto de amplificação utilizando os oligonucleotídeos *lrp*; B - produto de amplificação utilizando os oligonucleotídeos XAC0705 (*xcsN*); C - produto de amplificação utilizando os oligonucleotídeos XAC3534 (*xpsD*)

5.2.2 RT-qPCR

Visando analisar a expressão dos dois *operons* do sistema de secreção tipo II de *Xac* em diferentes condições, dentre elas durante a interação com a planta hospedeira (infecção), foram preparados cDNAs a partir dos RNAs extraídos da linhagem selvagem submetida aos seguintes tratamentos: crescimento em meio complexo (NBY), crescimento em meio mínimo indutor de formação de biofilme de *Xac* (YMM), crescimento em meio indutor de genes de resposta de hipersensibilidade em planta (*hrp*) (XVM2) e crescimento em planta hospedeira. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os RNA extraídos foram visualizados em gel de agarose desnaturante (Figura 27) e quantificados em espectrofotômetro. A síntese do cDNA seguiu a técnica de RT-PCR com oligonucleotídeos randômicos.

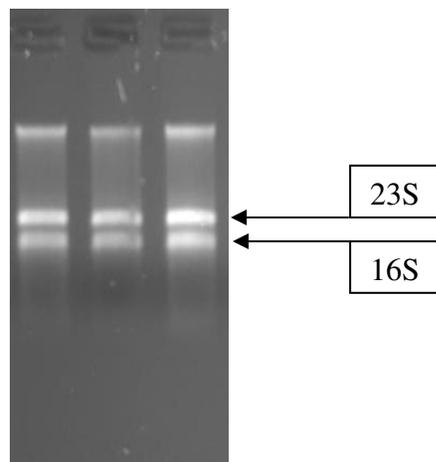


Figura 27. Eletroforese em gel de agarose desnaturante com amostras de RNA (triplicata)

Os estudos dos níveis de expressão gênica dos *operons* *xcs* e *xps* utilizaram *primers* que amplificam fragmentos dos últimos genes de cada *operon* (*xcs*NqPCR e *xps*DqPCR). As análises dos dados foram realizadas de forma relativa, e os resultados foram normalizados com relação a

expressão do gene endógeno *lrp* (Cubero e Graham, 2003).

A expressão relativa desses genes em *Xac* nas diferentes condições de crescimento (planta, meio NBY, meio XVM2 e meio YMM) evidenciou o maior nível de expressão do último gene do operon *xps* (*xpsD*) em relação ao último gene do operon *xcs* (*xcsN*), em todas as condições de crescimento analisadas (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de expressão relativa e respectivos desvios das médias das três repetições biológicas de cada condição de crescimento.

Expressão Relativa	Planta	NBY	XVM2	YMM
<i>xcsN</i>	0,308 ± 0,048	0,341 ± 0,117	0,080 ± 0,038	0,029 ± 0,011
<i>xpsD</i>	189,151 ± 35,707	105,964 ± 17,938	2,813 ± 1,993	19,844 ± 2,557

Na Figura 28 estão representados os níveis de expressão relativa dos genes *xcsN* e *xpsD* nos diferentes tratamentos analisados. Os menores níveis de expressão relativa do gene *xcsN* foram constatados na linhagem selvagem com crescimento em meio XVM2. Quando analisado na bactéria crescida em YMM, verificou-se nível de expressão intermediário, sendo maior que em meio XVM2 e menor que em NBY e planta.

O gene *xpsD* apresentou perfil de expressão distinto do gene *xcsN* nas diferentes condições de crescimento de *Xac*, diferindo, sobretudo, na magnitude dos valores. Diferentemente do gene *xcsN*, o menor nível de expressão de *xpsD* foi observado na bactéria com crescimento em meio YMM. Para a linhagem com crescimento em meio XVM2, a expressão relativa de *xpsD* foi maior que em YMM, porém, como constatado para o gene *xcsN*, foi inferior aos níveis observados em NBY e planta.

Os maiores níveis de expressão, tanto para *xcsN* quanto para *xpsD*, foram verificados na

condição infectante, ou seja, na bactéria selvagem recuperada de planta. O meio NBY foi o que mais causou semelhanças nos níveis de expressão, tanto de *xcsN* quanto *xpsD*, com os observados para a bactéria em condição infectante.

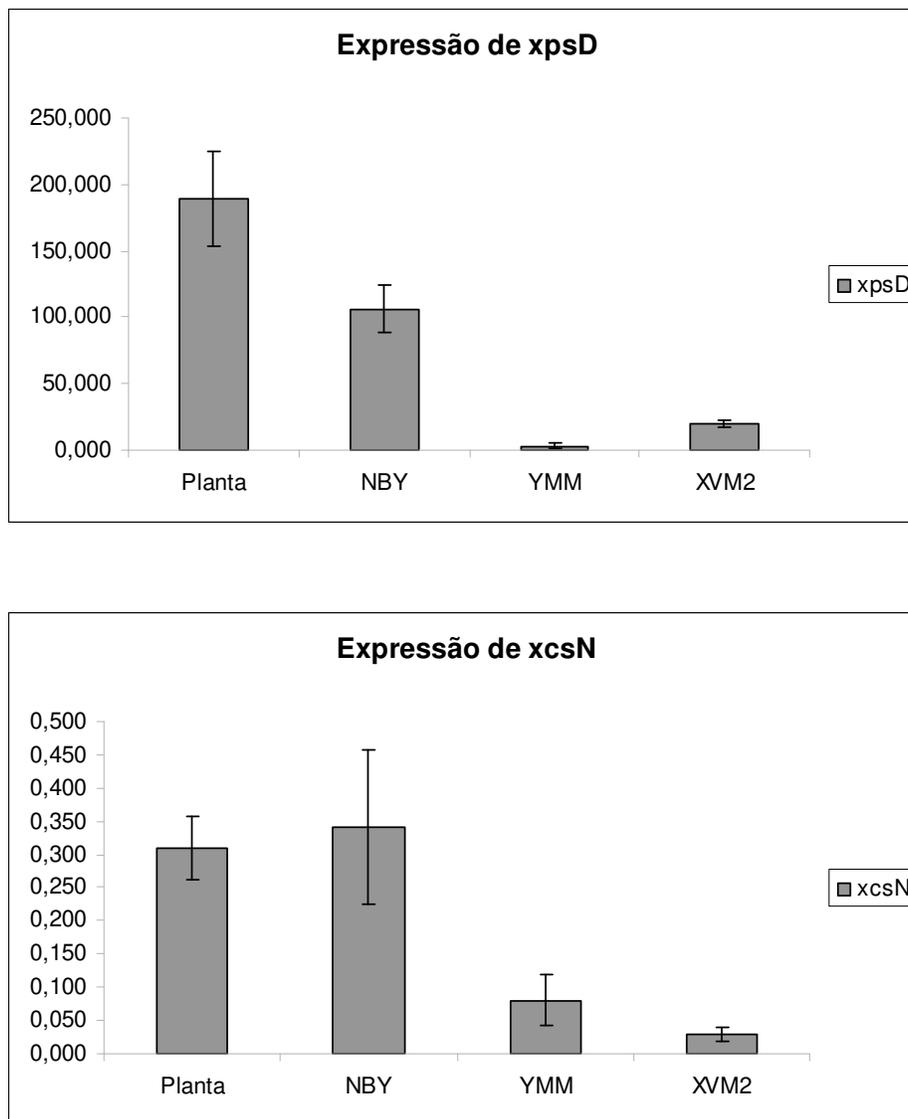


Figura 28. Gráficos de expressão relativa dos genes *xpsD* (último do *operon xps*) e *xcsN* (último do *operon xcs*) de *Xac* na planta de citros, e nos meios NBY, YMM e XVM2. Erro padrão da média representado por linha vertical no centro das barras

5.3 Síntese dos resultados obtidos

A tabela 4 apresenta, de maneira resumida, todos os resultados de análises fenotípicas dos mutantes gerados nesse estudo. Notas máximas, representadas pelos sinais +++, foram dadas aos fenótipos apresentados pela bactéria selvagem para o desenvolvimento de cancro cítrico na planta hospedeira por dois métodos de inoculação (infiltração e espalhamento), capacidade de degradação de compostos (amido, CMC e proteína), adesão em superfície abiótica e formação de biofilme *in vitro*. As alterações fenotípicas dos mutantes foram diferenciadas recebendo sinais – ao invés de +, sendo as maiores diferenças sinalizadas com ---.

Tabela 4. Síntese dos resultados das análises fenotípicas dos mutantes.

	<i>Xac306</i>	<i>306ΔxcsD</i>	<i>306xpsD</i>	<i>306ΔxcsDxpsD</i>
Cancro cítrico (infiltração)	+++	++-	--+	--+
Cancro cítrico (espalhamento)	+++	---	--+	---
Degradação de compostos	+++	+++	---	---
Adesão em superfície abiótica	+++	---	---	---
Formação de biofilme <i>in vitro</i>	+++	---	--+	---

6 DISCUSSÃO

O objetivo do sequenciamento do genoma de *Xac* foi, além de caracterizar estruturalmente as sequências codificadoras, possibilitar abordagens funcionais no estudo da genética desse fitopatógeno que elucidem os mecanismos utilizados na interação com a planta hospedeira e manifestação do cancro cítrico. O SSTII constitui uma via de importância para a virulência de muitos fitopatógenos. A presença de dois agrupamentos gênicos codificantes para o SSTII no genoma de *Xac* e a falta de informações da importância funcional desses sistemas na patogenicidade e virulência dessa bactéria justificam o seu estudo.

A obtenção de mutantes funcionais representa valiosa ferramenta no estudo do papel desempenhado por sequências específicas do genoma. As mutações geradas neste estudo, visando a abordagem funcional do SSTII, foram direcionadas aos genes que codificam para as proteínas responsáveis pela formação dos poros de secreção desse sistema, ou seja, XcsD e XpsD. A metodologia empregada para a obtenção dos mutantes de *Xac*, tanto para apenas um gene (306 Δ xcsD e 306 Δ xpsD) quanto para dois genes na mesma linhagem (306 Δ xcsDxpsD), utilizando o plasmídeo pCR2.1TOPO como vetor suicida, e meio de cultivo suplementado com 10% de glicerol, apresentou alta eficiência de transformação. As sequências clonadas nesse vetor não replicativo em *Xac*, por eventos de recombinação homóloga simples, causaram mutações únicas e estáveis no genoma dessa bactéria, as quais foram confirmadas por *Southern blot*. A linhagem 306 Δ xpsD reproduziu os mesmos fenótipos, tanto em planta hospedeira quanto para degradação de CMC em placa, apresentados pelo mutante para o gene *xpsD*, aqui referido como 306 Δ Tn5*xpsD*, produzido em coleção de linhagens mutantes gerada por inserção aleatória de *transposon* no genoma de *Xac* (Baptista, 2006).

Além do composto CMC, analisou-se a capacidade das linhagens mutantes e selvagem de

degradar amido e proteína. Esses resultados demonstraram experimentalmente que *Xac*, além de degradar CMC, também é capaz de degradar amido e proteína em condições artificiais de cultivo. As linhagens 306 Δ *xpsD* e 306 Δ *xcsDxpsD*, como esperado, apresentaram drástica redução no diâmetro dos halos de degradação de amido, CMC e proteína. Como especulado por Baptista (2006), a degradação de CMC observada para o mutante 306 Δ Tn5*xpsD* é devida ao contato e/ou morte celular bacteriana, já que em ensaios de capacidade de degradação enzimática utilizando sobrenadantes filtrados da linhagem mutante não foram constatadas atividades enzimáticas de degradação de CMC.

Os fenótipos provocados pelos mutantes funcionais do sistema *xps* em *Xac* com relação à secreção de enzimas hidrolíticas e virulência em planta hospedeira se assemelham aos resultados obtidos para mutantes desse mesmo sistema em *X. campestris pv. campestris* (Chen *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1998), *Xoo* (Ray *et al.*, 2000; Jha *et al.*, 2007) e *Xac* (Yamazaki *et al.*, 2007; Baptista, 2006). O perfil de degradação da linhagem 306 Δ *xcsD* para os três compostos avaliados foi idêntico ao apresentado pela linhagem selvagem, demonstrando que o sistema codificado por *xcs* não desempenha papel funcional na secreção de enzimas degradadoras de amido, CMC e proteína.

Porém, as três linhagens mutantes analisadas causaram alterações fenotípicas em planta hospedeira. Essas alterações, quantificadas por curvas de crescimento *in vivo*, demonstram que até mesmo a linhagem 306 Δ *xcsD*, que não apresentou diferença na degradação de nenhum dos compostos em placa, apresentou ligeira redução no número de bactérias infectantes aos 21 DAI. A diferença sintomática causada por esse mutante inoculado por infiltração é muito tênue, e constatada apenas no início da infecção (3 DAI). Porém, quando inoculado na planta pelo método de espalhamento em folha, é claramente detectado menor número de lesões de cancro aos 30 DAI, demonstrando que a mutação nesse gene, de alguma maneira, influi na virulência dessa

bactéria. Até o momento não havia sido relatada mutação funcional em seqüências homólogas a genes do agrupamento *xcs* de outro fitopatógeno.

A bactéria *Xac*, como muitos outros fitopatógenos, penetra no tecido hospedeiro através de aberturas naturais como os estômatos, ou através de ferimentos (Graham, *et al.*; 1992). Apesar de sobreviver por meses em restos foliares presentes no solo, quando na superfície foliar essa bactéria não resiste mais do que poucas horas exposta às adversidades do ambiente (Graham *et al.* 1989; Graham *et al.*, 2004). Por isso, um rápido processo de fixação à superfície e penetração no mesófilo foliar é essencial para a colonização bacteriana e estabelecimento do cancro cítrico.

O menor número de lesões de cancro causadas pelos mutantes, em comparação com as observadas para a bactéria selvagem, inoculados por método proximamente relacionado com a condição real de infecção (espalhamento na superfície abaxial de folhas de citros), sugere que as mutações, tanto no gene *xcsD* quanto *xpsD*, influíram na capacidade de fixação e colonização do tecido hospedeiro vegetal. As análises de adesão em superfície abiótica demonstraram que todas as linhagens mutantes dos SSTII não se aderiram da mesma forma que a bactéria selvagem. Esses resultados demonstram que o SSTII de *Xac* desempenha papel funcional tanto na secreção de enzimas quanto no processo de adesão, e corroboram com as funções desse sistema propostas em *P. aeruginosa* (Durand *et al.*, 2003). Entretanto, em *P. aeruginosa*, mutações no segundo *operon* do SSTII, chamado de *hxc*, que se mostrou funcional para a secreção de fosfatase alcalina em resposta a baixos níveis de fosfato no meio (Ball *et al.*, 2002), não influenciaram no processo de adesão (Overhage *et al.*, 2007).

O processo de adesão de microrganismos a superfícies sólidas é favorecido pela presença de estruturas do tipo pili, que são organelas filamentosas extracelulares presentes na superfície bacteriana e constituem um importante fator de virulência de muitos patógenos. Como proposto em *Xcc*, o pseudopilus do SSTII, composto principalmente pela subunidade XpsG, forma uma

estrutura tipo pili, provavelmente ancorada na membrana interna, que extravasa a membrana externa desse fitopatógeno. Análises de imuno-marcação da proteína XpsG em uma linhagem mutante para o poro de secreção (XpsD) apresentaram baixos níveis dessa proteína no meio extracelular, em comparação com os níveis apresentados para a bactéria selvagem. Esses baixos níveis foram relacionados à funcionalidade de um segundo sistema de secreção tipo II em *Xcc*, que até aquele momento não havia sido identificado pelo sequenciamento dessa bactéria (Hu *et al.*, 2002). Em estudos anteriores a esse, onde o SSTII de *Klebsiella oxytoca* foi expresso em *E. coli*, já havia sido constatada a formação de estruturas tipo pili extravasando a membrana externa (Sauvonnet *et al.*, 2000). Essas estruturas foram capazes de promover vigorosa aderência dos microrganismos a superfícies de vidro e plástico e também mediar a formação de microcolônias através de interações entre células bacterianas (Vignon *et al.*, 2003). As análises de Vignon também demonstraram que mutações no gene do poro de secreção (*pulD*) não causam total abolição na montagem extracelular da estrutura tipo pili (*pulG*), quando esse gene é super-expresso em *E. coli*. Porém, as estruturas formadas apresentam deformações e causam perturbações estruturais na membrana bacteriana.

Durand e colaboradores (2003) também propuseram que a elongação dos pseudopili bloqueia a secreção de exoproteínas, e que uma ocupação permanente na cavidade do poro secretório por essa estrutura é incompatível com o processo de secreção de proteínas. O papel desempenhado pelos pseudopili parece ser funcionalmente importante para o SSTII de *P. aeruginosa*. Em homologia ao pilus do sistema pili tipoIV, os pseudopili do SSTII apresentariam um processo dinâmico de contração e extravasamento que funcionaria como um tipo de pistão direcionando a secreção de enzimas hidrolíticas através do poro secretório. Alternativamente, esses pseudopili poderiam exercer a função de uma estrutura tipo “rolha”, que bloquearia a secreção de proteínas para o meio extracelular (Nouwen *et al.*, 1999; Filloux, 2004).

Porém, redução na capacidade de fixação de *Xac* em folhas de citros e diminuição na capacidade de adesão em superfície abiótica também foram constatadas para um mutante não produtor de exopolissacarídeos. Esse mutante, além da reduzida virulência em planta hospedeira, se mostrou incapaz de formar biofilme estruturado *in vitro* e *in vivo* (Rigano et al., 2007). A goma xantana exerce importante papel na infecção de *X. campestris* pv. *campestris*. Esses exopolissacarídeos, por suprimirem algumas respostas de defesa da planta, como deposição de caloses, aumentam a susceptibilidade do hospedeiro (Yun et al., 2006).

A quantificação dos exopolissacarídeos (goma xantana) produzidos pelas linhagens 306 Δ *xpsD* e 306 Δ *xcsD**xpsD* demonstrou aumento significativo em comparação à goma produzida pela linhagem selvagem. Esses resultados diferem dos obtidos em *V. cholerae*, onde mutações no gene da proteína GspD do SSTII causaram, além de perda de motilidade e diminuição nos níveis de secreção da toxina da cólera e hemolisina, a abolição da secreção de exopolissacarídeos (Ali et al., 2000). O mesmo fenótipo não foi observado para o mutante 306 Δ *xcsD*, que produziu quantidade de goma significativamente igual à observada na linhagem selvagem. É possível especular que o aumento na quantidade de goma produzida pelas linhagens 306 Δ *xpsD* e 306 Δ *xcsD**xpsD* seja devido à ausência de secreção de alguma enzima que, direta ou indiretamente, regule a síntese e/ou secreção de exopolissacarídeos, ou ainda, que a não funcionalidade desse sistema pode, de alguma maneira, devido a uma condição de estresse gerada, sinalizar para maior expressão dos genes responsáveis pela síntese de goma. Análises das respostas fisiológicas da planta infectada com os mutantes super-produtores de goma xantana elucidariam o papel desempenhado por esse composto na interação *Xac*-citros.

A formação da estrutura tridimensional inerente ao biofilme é um processo dinâmico e envolve uma série coordenada de eventos moleculares que compreendem mecanismos de adesão, agregação e expansão da comunidade microbiana. No presente estudo, a análise de microscopia

confocal identificou uma diferença estrutural nos biofilmes formados pelas linhagens. Enquanto a linhagem selvagem apresentou uma base de bactérias aderidas com 15 horas após inoculação em meio indutor de formação de biofilme, nas linhagens mutantes essa base foi observada somente 40 horas após a inoculação. Nenhuma das linhagens mutantes foi capaz de formar biofilme maduro e estruturado, em oposição àquele formado pela linhagem selvagem. A comparação da linhagem com dupla mutação com as demais linhagens indica uma complementariedade desses sistemas na estruturação do biofilme, estando o sistema *xcs* aparentemente mais envolvido no processo inicial de adesão e o *xps* na maturação do biofilme. Enfim, os dois sistemas, em conjunto, são necessários para a formação de biofilme estruturado.

Como constatado por Overhage e colaboradores (2007), mutações em *P. aeruginosa* para genes homólogos aos genes do sistema *xps* de *Xac* causaram, além de redução de mobilidade em superfície, diminuição na capacidade de formação inicial do biofilme. Porém, em discordância com os resultados observados no presente estudo com *Xac*, mutações no gene *xcpQ*, homólogo a *xpsD* de *Xac*, não reproduziram os mesmo fenótipos das outras linhagens para mobilidade e formação de biofilme. Entretanto, nesse microrganismo foi relatado que um homólogo de *xcpQ*, nomeado *xqhA* (xcpQ homologue A), é capaz de suplementar a função secretória exercida por este (Martínez *et al.*, 1999) e, por isso, mutantes simples para *xcpQ* em *P. aeruginosa* continuam sendo funcionais e não diferem na formação de biofilme.

Considerando que a expressão de todos os genes de um mesmo *operon* em procariotos é, em geral, controlada por uma única região promotora, resultando na produção de mRNA policistrônico, é possível inferir que a expressão dos últimos genes representa a expressão de todo o *operon*. A análise da expressão dos *operons* do SSTII de *Xac* (*xcs* e *xps*), realizada no presente estudo, demonstrou que os últimos genes de cada um destes conjuntos gênicos é expresso tanto em condição infectante (expressão *in planta*) como em condições artificiais de cultivo.

Resultados similares foram obtidos em análises de expressão (RT-PCR) do gene *xpsE* presente em *X. fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros. Esses estudos demonstraram que o primeiro gene do *operon xps* é expresso e positivamente regulado na bactéria em condição infectante (Souza *et al.*, 2003). Em estudo de análise global de expressão de genes relacionados à formação de biofilme desse mesmo fitopatógeno, foi verificado que os genes *xpsD* e *xpsH* apresentam aumento nos níveis de expressão nessa condição de crescimento (Souza *et al.*, 2004), indicando a importância funcional do SSTII de *X. fastidiosa* na formação do biofilme e virulência desse microrganismo.

A maior similaridade nos níveis de expressão dos *operons xcs* e *xps* entre as condições infectantes (planta hospedeira) e cultivo em NBY (meio rico) pode ser devida ao perfil das enzimas secretadas via SSTII, as quais estão em geral relacionadas à degradação de compostos poliméricos de cadeia longa (Sandkvist, 2001; Cianciotto, 2005), que não estão presentes nos meios mínimos e definidos. O meio de crescimento NBY apresenta vários compostos poliméricos de cadeia longa, os quais devem ser digeridos extracelularmente antes de disponibilizados como fonte de carbono para o metabolismo de *Xac*. A maior necessidade de enzimas hidrolíticas nessa condição poderia explicar o maior nível de expressão do SSTII nesse meio de cultura.

Menores níveis de expressão do *operon xcs* em relação a *xps* foram detectados em todas as condições analisadas. Como demonstrado nesse trabalho, o sistema codificado por *xcs* parece estar relacionado diretamente ao processo de adesão e formação de biofilme e não se mostra funcional para secreção de enzimas hidrolíticas. Em *P. aeruginosa* foi verificado que genes do *operon hxc*, homólogo a *xcs*, apresentaram expressão diferencial em condições de cultivo com baixas quantidades de fosfato (Ball *et al.*, 2002).

Considerando que a bactéria selvagem foi recuperada de cultivos em meios de cultura artificiais sob agitação, e da planta hospedeira, sempre na fase exponencial de crescimento,

condições essas que não induzem a adesão bacteriana, seria esperado um menor nível de expressão do *operon xcs* nessas condições de crescimento de *Xac*. Ou ainda, como especulado por Durand *et al.* (2003), quando na condição de biofilme, a funcionalidade adesiva desempenhada pelos pseudopili dos SSTII poderia ser mais necessária do que a funcionalidade secretória, refletindo assim as diferenças nos níveis de expressão.

7 CONCLUSÕES

Xac apresenta dois SSTII independentes e funcionais na manifestação do cancro cítrico.

Os operons *xcs* e *xps* são expressos na planta hospedeira e em meios de cultivo artificiais.

Ao contrário do sistema codificado pelo *operon xcs*, o sistema codificado por *xps* é funcional para a secreção de enzimas degradadoras de amido, celulose e proteína.

Mutação no gene *xpsD* de *Xac* influi positivamente na produção de goma xantana.

As linhagens com mutações nos genes *xcsD* e *xpsD* apresentam reduzida capacidade de adesão em superfícies abiótica e biótica.

A formação de biofilme é influenciada pelos dois SSTII de maneira distinta.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, A.; Johnson, J. A.; Franco, A. A.; Metzger, D. J.; Connell, T. D.; Glenn Morris Jr, J.; Sozhamannan, S. Mutation in the extracellular protein secretion pathway genes (*eps*) interfere with rugose polysaccharide production in and motility of *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1967-1974, 2000.

Astua-Monge, G.; Freitas-Astua, J.; Bacocina, G.; Roncoletta, J.; Carvalho, S.A.; Machado, A. M. Expression Profiling of Virulence and Pathogenicity Genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J. Bacteriol.**, v. 187, p. 1201-1205, 2005.

Ball, G.; Durand, E.; Lazdunski, A.; Filloux, A. A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 475-485, 2002.

Baptista, J. C. **Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***. 2006. 110 p. Dissertação de mestrado. Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP,.

Benders, G. A.; Powell, B. C.; Hutchison, C. A. III. Transcriptional analysis of the conserved *ftsZ* Gene Cluster in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. **J. Bacteriol.** 187: 4542-4551, 2005.

Berks, B. C. ; Palmer, T.; Sargent, F. The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. **Adv. Microb. Physiol.** v. 47, p. 187-254, 2003.

Boyd, J. M.; Dacanay, A.; Knickle, L. C.; Touhami, A.; Brown, L. L.; Manfred H. Jericho, M. H.; Johnson, S. C.; Reith, M. Contribution of Type IV Pili to the Virulence of *Aeromonas salmonicidasubsp. salmonicida* in Atlantic Salmon (*Salmo salar L.*). **Infect. Immun.**, v. 76, p. 1445-1455, 2008.

Brunings, A. M.; Gabriel, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 3, p. 141-157, 2003.

Büttner, D.; Bonas, U. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. **The EMBO Journal**, v. 21, n.20, p. 5313-5322, 2002.

Cascales, E.; Christie, P. J. The versatile bacterial type IV secretion system. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 1, p. 137-149, 2003.

Chen, L.; Chen, D.; Miaw, J. Hu, N. XpsD, an outer membrane protein required for protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, forms multimer. **J. Biol. Chemistry**, v. 271, p. 2703-2708, 1996.

Cianciotto, N. P. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. **TRENDS in Microbiology** v.13, p. 581-588, 2005.

Coltri, P. P., Rosato, Y. B. Transcription analysis of pilS and xpsEL genes from *Xylella fastidiosa*. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v.87, n.3, p.253-7, 2005.

Cubero, J. and Graham, J.H. The leucine responsive regulatory protein (lrp) gene for characterization of the relationship among *Xanthomonas* spp. **Int. J. Syst. Evol. Micro.**, in press (2003).

da Silva, A.C.R.; Ferro, J.A.; Reinach, F.C.; Farah, C.S.; Furlan, L.R. *et al.* Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v. 417, p. 459-463, 2002.

d'Enfert, C.; Ryter, A.; Pugsley, A. P. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. **EMBO J.**, v. 6, p. 3531-3538, 1987.

De Feyter, R., Yan, Y., and Gabriel, D.W. Gene-for-gene interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 6, p. 225-237, 1993.

de Keyzer, J.; van der Does, C.; Driessen, A. J. The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 60, p. 2034-2052, 2003.

De La Fuente, L.; Thomas J. Burr, T. J.; Hoch, H. C. Autoaggregation of *Xylella fastidiosa* cells is influenced by type I and type IV pili. **Appl. Environ. Microbiol.** AEM Accepts, published online ahead of print on 18 July 2008

Desvaux, M.; Parham, N. J.; Henderson, I. R. Type V protein secretion: simplicity gone awry?

Curr. Issues Mol. Biol. v. 65, p. 111-124, 2004.

Duan, Y.P.; Castañeda, A.; Zhao, G.; Erdos, G.; Gabriel, D.W. Expression of a Single, Host-Specific, Bacterial Pathogenicity Gene in Plant Cells Elicits Division, Enlargement, and Cell Death. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 6, p. 556-560, 1999.

Durand, E.; Bernadac, A.; Ball, G.; Lazdunski, A.; Sturgis, J. N.; Filloux A. Type II protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the pseudopilus is a multifibrillar and adhesive structure. **J. Bacteriol.** v. 185, p. 2749–2758, 2003.

FAO (Food and Agriculture Organization) www.fao.org/docrep/006/y4343e/y4343e06.htm, 2008.

Filloux, A. The underlying mechanisms of type II secretion. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1694, p. 163-179, 2004.

Filloux, A., Hachani, A., Bleves, S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology**, v. 154, p. 1570-1583, 2008.

Folkkeson, A.; Lofdahl, S.; Normark, S. The salmonella enterica subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living close contact with eukaryotic cells. **Res. Microbiol.** v. 153, 537-545, 2002.

Fundecitrus (Fundo de Defesa da Citricultura) <http://www.fundecitrus.com.br/>, 2008.

Furutani, A.; Tsuge, S.; Ohnishi, K.; Hikichi, Y., Oku., T.; Tsuno, K. Inoue, Y.; Ochiai, H. Kaku, H.; Kubo, Y. Evidence for HrpXo-Dependent Expression of Type II Secretory Proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1347-1380, 2004.

Gentshev, I.; Dietrich., G.; Goebel., W. The E. coli alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. **Trends Microbil.** v. 10, p. 39-45, 2002.

González-Pedrajo, B.; Dreyfus, G. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelary translocación de factores de virulencia. **Mensaje Bioquímico**, v. XXVII, 2003

Graham, J. H.; Gottwald, T. R.; Riley, T. D.; Achosr, D. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v. 82, p. 1319-1325, 1992.

Graham, J.H.; Gottwald, T.R.; Civerolo, E.L.; McGuire, R.G. Population dynamics and survival of *Xanthomonas campestris* in soil in citrus nurseries in Maryland and Argentina. **Plant Disease**, v. 73, p. 423-427, 1989.

Graham, J. H.; Gottwald, T. R.; Cubero, J.; Achor, D. S. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004.

Henderson, I. R.; Navarro-Garcia, F.; Desvaux, M.; Fernandez, R. C.; Aldeen, D. A. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 68, p. 692-744, 2004.

Herron, S. R.; Benen, J. A.; Scavetta, R. D.; Visser, J.; Journak, F. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, v.97, n.16, p.8762-8769, 2000.

Hu, N. T.; Hung, M. N.; Chen, D. C.; Tsai, R. T. Insertion mutagenesis of XpsD, an outer-membrane protein involved in extracellular protein secretion in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Microbiology**, v. 144, p. 1479-1486, 1998.

Hu, N. T.; Hung, M. N.; Chiou, S. J.; Tang, F.; Chiang, D. C.; Huang, H. Y.; Wu, C. Y. Cloning and characterization of a gene required for the secretion of extracellular enzymes across the outer membrane by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 2679- 2687, 1992.

Hu, N. T.; Leu, W. M.; Lee, M. S.; Chen, A.; Chen, S. C.; Song, Y. L.; Chen, L. Y. XpsG, the major pseudopilin in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, forms a pilus-like structure between cytoplasmic and outer membranes. **Biochem. J.**, v. 365, p. 205-211, 2002.

International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, 2., Flórida. **Post-hurricane analysis of citrus canker spread and progress towards the development of a predictive model for future weather related spread.** Irey, M.; Gottwald, T.; Graham, J.; Carlton, G.;

Riley, T. Crowne Plaza Orlando International, p. 15, 2005.

Jha, G.; Rajeshwari, R.; Sonti, R. V. Bacterial Type Two Secretion System Proteins: Double-Edged Swords for Plant Pathogens. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 18, n. 9, p. 891-898, 2005.

Jha, G.; Rajeshwari, R.; Sonti, R. V. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 20, p. 31-40, 2007.

Katzen, F.; Ferreiro, D. U.; Oddo, C. G.; Ielmini, M.V.; Becker, A.; Phler, A.; Ielpi, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xantham biosynthesis and plant virulence. **J. Bacteriol.**, v.180, n.7, p.1607-1617, 1998.

Laranjeira, F.F.Palazzo, D.A. Danos qualitativos a produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, v. 20: p. 77-91, 1999.

Leite Jr., R. P. Surviving with citrus canker in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.2, p.890-896, 2000.

Livak, K.J.; Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. **METHODS** v. 25, p. 402–408, 2001.

Lu, H. M., Motley, S. T.; Lory, S. Interactions of the components of the general secretory pathway: role of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin subunits in complex formation and

extracellular protein secretion. **Mol. Microbiol.**, v. 25, p. 247-259, 1997.

Martínez, A.; Ostrovsky, P.; Nunn, D. N. LipC, a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, é LipB e Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pilus biogenesis components. **Mol. Microbiol.** v. 34, p. 317-326, 1999.

Mougous, J. D.; Cuff, M. E.; Raunser, S.; Shen, A.; Zhou, M.; Gifford, C. A.; Goodman, A. L.; Joachimiak, G.; Ordoñez, C. L. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. **Science**, v. 312, p. 1526-1530, 2006.

Michiels, T.; Wattiau, P.; Brasseur, R.; Ruyschaert, J. M.; Cornelis, G. Secretion of Yop proteins by yersiniae. **Infect. Immun.** v. 58, p. 2840-2849, 1990.

Moreira, L. M.; de Souza, R. F.; Almeida Jr, N. F.; Setúbal, J. C.; Oliveira, J. C. F.; Furlan, L. R.; Ferro, J. A.; da Silva, A. C. R. Comparative genomic analyses of citrus-associated bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 42, p. 163-184, 2004.

Nouwen, N.; Ranson, N.; Saibil, H.; Wolpensinger, B.; Engel, A.; Ghazi, A.; Pugsley, A. P. Secretin PulD: association with pilot protein PulS, structure and ion-conducting channel formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 8173–8177, 1999.

Overhage, J.; Lewenza, S.; Marr, A. K.; Hancock, R. E. W. Identification of genes Involved in

Swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-*lux* mutant library. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 2164-2169, 2007.

Pruvost, O.; Boher, B.; Brocherieux, C.; Nicole, M.; Chiroleu, F. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* leaf lesions under tropical environmental conditions and simulated splash dispersal of inoculum. **Phytopathology**, v. 92n. 4, p. 336-346, 2002.

Pukatzki, S.; Ma, A. T.; Sturtevant, D.; Krastins, B.; Sarracino, D.; Nelson, W. C.; Heidelberg, J. F.; Mekalanos, J. J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 103, p. 1528-1533, 2006.

Qian, W.; Jia, Y.; Ren, S.; He, Q.; Feng, J.; *et al.* Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Res.**, v. 15, p. 757 – 767, 2005.

Ray, S. K., Rajeshwari, R., and Sonti, R. V. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 13, p. 394-401, 2000.

Rigano, L. A.; Siciliano, F.; Enrique, R.; Sendín, L.; Filippone, P.; Torres, P. S.; Qüesta, J.; Dow, M.; Castagnaro, A. P.; Vojnov, A. A.; Marano M. R. Biofilm Formation, Epiphytic Fitness, and Canker Development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v.

20, p. 1222-1230, 2007.

Rodrigues Neto, J.; Ribeiro, J.G.B. **Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico**. Brasília: MAPA/SDA/DDIV, 66p.; il. Color; 2002.

Russel, M. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. **Journal of Molecular Biology**, v.279, p.485-499, 1998.

Rossetti V. V. **Manual ilustrativo de doenças dos citros**. ed. FEALQ/FUNDECITROS, 2001. 207pp.

Russo, D. M.; Williams, A.; Edwards, A.; Posadas, D. P.; Christine Finnie, C.; Dankert, M. .; Downie, J. A.; Angeles Zorreguieta, A. Proteins Exported via the PrsD-PrsE Type I Secretion System and the Acidic Exopolysaccharide Are Involved in Biofilm Formation by *Rhizobium leguminosarum*. **J. Bacteriol.** v. 188, n. 12, p. 4474-4486, 2006.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

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

Sandkvist, M.; Michel, L. O.; Hough, L. P.; Morales, V. M.; Bagdasarian, M.; Koomey, M.; Dirita, V. J.; Bagdasarian, M. General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion

and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.** v. 197, n. 22, p. 6994-7003, 1997.

Sauvonnet, N.; Vignon, G.; Pugsley, A. P.; Gounon, P. Pilus formation and protein secretion by the same machinery in *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v. 19, p. 2221-2228, 2000.

Schubert, T. S.; Rizvi, S. A.; Sun, X.; Gottwald, T. R.; Graham, J. H.; Dixon, W. N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida—again. **Plant Disease**, v.85, n.4, p.340-356, 2001.

Shevchik V. E.; Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. PaeX, a second pectin acetyltransferase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.10, p.3091-3100, 2003.

Shiue, S. J.; Kao, K. M.; Leu, W. M.; Chen, L. Y.; Chan, N. L.; Hu, N. T. XpsE oligomerization triggered by ATP binding, not hydrolysis, leads to its association with XpsL. **EMBO Journal**, 25(7):1426-35, 2006.

Souza, A.A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Goldman, G. H.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; Costa de Oliveira, R.; Nunes L. R.; Machado M. A. Analysis of gene 42 expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. **Mol. Plant-Microb. Interact** v. 16 p. 867-875, 2003.

Souza, A. A.; Takita, M. A.; Coletta-Filho, H. D.; Caldana, C.; Yanai, G. M.; Muto, N. H.; de Oliveira, R. C.; Nunes, L. R.; Machado, M. A. Gene expression profile of the plant pathogen

Xylella fastidiosa during biofilmformation in vitro. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 237, p. 341-353, 2004.

Stuurman, N.; Bras, C. P.; Schlaman, H. R. M.; Wijfjes, A. H. M.; Bloemberg, G.; Herman P. Spaijk, H. P. Use of Green Fluorescent Protein Color Variants Expressed on Stable Broad-Host-Range Vectors to Visualize Rhizobia Interacting with Plants. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 13 p. 1163-1169. 2000.

Simpson, A.J.; Reinach, F. C.; Arruda, P.; Abreu, F. A.; Acencio, M. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v. 406, p. 151-157, 2000.

Suvendra, K. R.; Rajeshwari, R.; Ramesh, V. S. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in General secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. **Molecular Plant Microb Interaction**, v. 13, n. 4, p. 394-401, 2000.

Thanassi, D. G.; Hultgren, S. J. Multiple pathway allow protein secretion across the bacterial outer membrane. **Curr. Op. Cell. Biol.** v. 12, p. 420-430, 2000.

Timmer, L. W.; Garnsey, S. M.; Graham, J. H. (eds.). **Compendium of citrus diseases**. 2. ed. St. Paul: APS Press, 2000. 92p.

Vauterin, L.; Hoste, B.; Kersters, K.; Swings, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45 p. 472-489, 1995.

Vignon, G.; Kohler, R.; Larquet, E.; Giroux, S.; Prévost, M. C.; Roux, P.; Pugsley, A. P. Type IV – like pili formed by the type II secreton: specificity, composition, bundling, polar localization, and surface presentation of peptides. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 3416-3428, 2003.

Vernière, C. J.; Gottwald, T. R.; Pruvost, O. Disease development and symptom expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in various citrus plant tissues. **Phytopathology**, v. 93, n. 7, p. 832-843, 2003.

Viprey, V.; Del Greco, A.; Golinowski, W.; Broughton, W. J.; Perret, X. Symbiotic implications of type III secretion machinery in *Rhizobium*. **Mol. Microbiol.**, v. 8, p. 123-131, 1998.

Yamazaki, A.; Hirata, H. Tsuyumu, S. HrpG regulates type II secretory proteins in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **J. Gen. Plant. Pathol.** v. 74, p. 138-150, 2007.

York, G. M.; Walker, G. C. The *Rhizobium melilot* *exoK* gene and the *prsD/prsE/exsH* genes are components of independent degradative pathways which contribute to production of low-molecular-weight succinoglycan. **Mol. Microbiol.** v. 25, p. 117-134, 1997.

Yun, M. H.; Torres, P. S.; El Oirdi, M., Rigano, L. A.; Gonzalez-Lamothe, R.; Marano, M. R.; Castagnaro, A. P.; Dankert, M. A.; Bouarab, K.; Vojnov, A. A. Xanthan induces plant susceptibility by suppressing callose deposition. **Plant Physiol**, v. 141, p. 178–187, 2006.