

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Juliana Cristina Baptista

**“ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES DE DEGRADAÇÃO DE
CELULOSE DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Mestre em
Genética e Biologia Molecular na área de
Genética Vegetal e Melhoramento.

Orientador: Dr. Marcos Antonio Machado

Co-orientador: Dr. Alexandre Moraes do Amaral

Campinas
2006

DADE BC
HAMADA IT/UNICAMP
B229a
EX
MBO BC/ 70602
DC. 16.06.23.06
EÇO 11.00
TA 17/11/06
ID
16 ID 391212

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

B229a

Baptista, Juliana Cristina

Análise funcional de genes de degradação de
celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri / Juliana
Cristina Baptista. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Marcos Antonio Machado.

Co-orientador: Alexandre Morais do Amaral.

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

1. Cancro cítrico. 2. Genômica. 3. Parede celular
vegetal. I. Machado, Marcos Antonio. II. Amaral,
Alexandre Morais do. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rodt/ib)

Título em inglês: Functional analysis of genes for degradation of cellulose in *Xanthomonas axonopodis* pv. citri.

Palavras-chave em inglês: Citrus canker; Genomics; Plant cell walls.

Área de concentração: Genética de Microorganismos.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

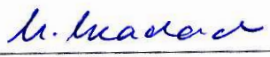
Banca examinadora: Marcos Antonio Machado, Nelson Arno Wulff, Julio Rodrigues Neto.

Data da defesa: 07/07/2006.

Campinas, 07 de julho de 2006.

Banca Examinadora

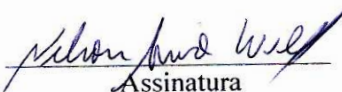
Prof. Dr. Marcos Antonio Machado (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Celso Eduardo Benedetti

Assinatura

Prof. Dr. Nelson Arno Wulff


Assinatura

Prof. Dr. Julio Rodrigues Neto

Assinatura

Profa. Dra. Suzete A. Lanza Destéfano


Assinatura

Dedico

*Aos meus pais, Dorival e Olga,
pelas valorosas lições de vida e pela eterna confiança em minhas escolhas.*

*As minhas irmãs Graziela e Kassima e
aos meus queridíssimos sobrinhos Marco e Mateo
pelo amor, carinho e por fazerem meus dias mais cheios de vida.*

*Ao Alonso
companheiro e amigo, que sempre me apoiou, com todo seu carinho, afeto e amor,
pelas incomparáveis alegrias e por constantemente me incentivar.*

Agradecimentos

Para chegar até aqui, muitos esforços se uniram e um simples agradecimento pode não representar a importância que teve essa força na caminhada. Lembrar de todas as pessoas que contribuíram, talvez seja impossível, porém aqueles que estiveram mais perto merecem um agradecimento muito especial.

Um agradecimento muito sincero ao Dr. Marcos Antonio Machado, pela rica orientação, confiança, apoio e amizade e pela oportunidade de ingressar nesta instituição.

Ao Dr. Alexandre Moraes do Amaral que em todos os momentos me auxiliou com seu amplo conhecimento, pela co-orientação, seriedade, educação e paciência, pela confiança, amizade, por sempre corrigir de forma construtiva as versões preliminares deste trabalho e principalmente pelo apoio e estímulo.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia pela companhia, pela ajuda em diversas etapas do trabalho, pela simpatia, pelos constantes estímulos, pelos agradáveis momentos de descontração e pelas amizades sinceras, que tanto facilitam a realização e o enriquecimento do nosso trabalho.

Aos eternos amigos: todos nós tomamos diferentes trilhas na vida, mas não importa aonde vamos, aproveitamos um pouco de cada uma delas em toda parte e nos tornamos especiais na vida uns dos outros.

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos pela confiança, amor e dedicação e por me trazerem tanta alegria, pois, mesmo sem perceberem, foram meus companheiros fazendo com que os dias mais árduos se tornassem mais brandos na batalha em busca dos meus objetivos.

Ao Alonso que me ensinou, entre outras coisas o valor e a grandiosidade da entrega, cumplicidade e do verdadeiro amor.

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” pela oportunidade de realização.

À Universidade Estadual de Campinas, por promover o crescimento e o conhecimento a todos os alunos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro aplicado nesta pesquisa.

A Deus pela presença constante em minha vida.

E a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu profundo e sincero agradecimento, pois acredito que este período não seria pleno sem o apoio e o auxílio de todos, que de alguma forma compartilhou seu saber.

“Há quem diga que todas as noites são de sonhos. Mas há também quem garanta que nem todas, só as de verão. No fundo, isso não tem importância. O que interessa mesmo não é a noite em si, são os sonhos. Sonhos que o homem sonha sempre, em todos os lugares, em todas as épocas do ano, dormindo ou acordado.”

William Shakespeare

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS DO ANEXO.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 A cultura dos citros.....	4
2.2 O cancro cítrico.....	5
2.3 A bactéria <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri.....	8
2.4 Disseminação e sobrevivência de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri.....	10
2.5 Mecanismos de alteração genética induzida em bactérias.....	12
2.6 A genômica e biologia de fitopatógenos.....	15
2.7 Parede celular vegetal e celulases.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento.....	25
3.2 Manutenção e crescimento da bactéria.....	27
3.3 Mutagênese por inserção aleatória.....	28
3.4 Mutagênese dirigida.....	28
3.5 Isolamento do DNA genômico, <i>Southern blot</i> e seqüenciamento.....	35
3.6 Ensaio em placa para atividade enzimática.....	36
3.7 Testes de patogenicidade.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Construção da coleção de linhagens obtidas por mutação.....	39
4.2 PCR, expressão do gene <i>gus</i> e <i>Southern Blot</i> para confirmação da transformação.....	41
4.3 Identificação da atividade de degradação do composto CMC dos mutantes ..	43
4.4 Identificação de mutantes aleatórios de <i>Xac</i> deficientes na degradação de celulose.....	46
4.5 Patogenicidade dos mutantes em ensaio biológico.....	48

5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE.....	84
ANEXOS	87

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquematização dos sistemas de secreção tipos I (SSTI), II (SSTII), III (SSTIII) e IV (SSTIV) e representação da passagem de produtos do citoplasma bacteriano para o meio externo e para células da planta hospedeira.....3
- Figura 2.** Danos causados em plantas de citros pela incidência de cancro cítrico. **A.** Fruto e folhas maduros; **B.** Frutos jovens; **C e D.** Ramo de folhas de laranja doce; **E.** Folha isolada; **E₁** superfície foliar abaxial; **E₂** superfície adaxial; **F.** Caule; **G e H.** Erradicação dos focos da doença em pomares (Fonte: A, B, E₁, E₂, F e H - Schubert et al., 2001; C, D, E - A. M. do Amaral; G - Fundecitrus).....8
- Figura 3.** Aspecto visual de células e colônias de *Xac*. **(a)** Microscopia eletrônica e **(b)** colônias em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Nutriente (Fonte: E. Kitajima e A. M. do Amaral).....10
- Figura 4.** Teste de inoculação por infiltração em tecido foliar. **A.** Infiltração em folhas da laranjeira Baía. **B.** Detalhe do “encharcamento” do tecido foliar provocado imediatamente após a inoculação.....37
- Figura 5.** Representação geral do nocaute gênico por recombinação homóloga simples com uso de plasmídeo “suicida” (setas negras indicam o local de pareamento dos *primers* para amplificação da ORF “truncada”).....40
- Figura 6.** Eletroforese em agarose (0,8%) com os produtos de amplificação (PCR) para confirmação de inserção de cassete com gene para resistência a kanamicina. **A.** Produtos de amplificação do gene *aph* (presente no cassete do plasmídeo pk18*mob*GUSII). M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: PCR com ausência de DNA; 2: Controle negativo (linhagem selvagem de *Xac* 306); 3: Controle positivo (pk18*mob*GUSII); 4: XAC0028; 5: XAC0029; 6: XAC0030; 7: XAC0143; 8: XAC0168; 9: XAC0346; 10: XAC0612; 11: XAC0661; 12: XAC1770; 13: XAC1793; 14: XAC2373; 15: XAC2374; 16: XAC2522; 17: XAC2986; 18: XAC3076; 19: XAC3516; 20: XAC3562; 21: XAC4231. **B.** Produtos de amplificação do gene *nptII*. M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: PCR com ausência de DNA; 2: Controle negativo (linhagem selvagem de *Xac* 306); 3 e 4:

Amplificação de DNA diretamente de colônia (diluições 1:10 e 1:100, respectivamente) do mutante aleatório 30E9.....41

Figura 7. Expressão do gene *gus* em colônias cultivadas em meio de cultura contendo X-gluc. **A.** Colônias de *E. coli* com o plasmídeo pK18*mob*GUSII em meio LB, após 24 horas de crescimento a 37 °C; **B.** Colônias de alguns mutantes dirigidos de *Xac* após crescimento por 48 h a 28 °C, em meio NBY com kanamicina (50µg/mL), evidenciando a atividade do gene *gus*.....42

Figura 8. *Southern blot* empregando o gene *nptII* (399 pb) como sonda para confirmação de inserção única. (1) Controle positivo da sonda; DNA genômico total do mutante 30E9 (gene *xpsD*) de *Xac* 306 digerido com enzimas de restrição (2: *EcoRI*, 3: *EcoRV*, e 4: *NcoI*) e linhagem selvagem (5).....43

Figura 9. Seleção inicial de colônias mutantes de *Xac* para clone defeutivo em degradação de celulose, em placa de CMC. **A.** Placa de Petri com colônias em meio CMC, após 48 horas da inoculação; **B.** Halo de degradação de CMC em placas de Petri após coloração com corante Vermelho do Congo (o halo amarelo indica a hidrólise da celulose).....43

Figura 10. Mutante randômico selecionado após os testes de degradação do composto CMC em placas de Petri. **A.** Deposição de suspensão da linhagem selvagem e do mutante (após 48 horas inoculação), à esquerda, e halo de degradação de CMC, após coloração com corante Vermelho do Congo, à direita; **B.** Placa de Petri com suspensão bacteriana depositada em orifícios produzidos no meio CMC (48 horas após a inoculação), à esquerda, e coloração resultante de corante Vermelho do Congo, à direita.....44

Figura 11. Mutantes sítio-dirigidos e aleatório (30E9) de *Xac* em placa de CMC. **A₁.** Placa de Petri com colônias crescidas em meio com CMC (48 horas após a inoculação); **A₂.** Halo de degradação de CMC em placas de Petri após coloração com corante Vermelho do Congo; **B₁.** Placa de Petri com colônias crescidas em orifícios produzidos no meio CMC (48 horas após a inoculação); **B₂.** Halo de degradação de CMC em placas de Petri após coloração com corante Vermelho do Congo. Setas indicam degradação diferenciada de CMC.....45

Figura 12. Placas de CMC evidenciando o diâmetro do halo de degradação da linhagem selvagem e dos mutantes produzidos. A₁. Placa de Petri com colônias em meio com CMC (48 horas após a inoculação); A₂. Halo de degradação de CMC em placas de Petri após coloração com corante Vermelho do Congo.....	46
Figura 13. <i>Operon xps</i> presente em <i>Xac</i> . A seta indica o gene que foi mutado na extremidade <i>dowstream</i>	47
Figura 14. Esquema hipotético da montagem do sistema de secreção do tipo II na membrana plasmática de célula de <i>Xac</i> , com setas indicando a direção de compostos secretados. A. Presença de todas as proteínas do <i>operon xps</i> ; B. Ausência da proteína XpsD.....	47
Figura 15. Placa de Petri com CMC e 7 µL dos sobrenadantes filtrados a partir do meio líquido XVM2 cultivado com as linhagens 30E9 e selvagem de <i>Xac</i> . A. Placa de Petri com a suspensão filtrada imediatamente após a deposição; B. Halo de degradação de CMC após coloração com corante Vermelho do Congo; C. Halo de degradação de CMC em placas de Petri 24h, 48h, 72h e 96h após a deposição da suspensão.....	48
Figura 16. Curvas de crescimento em tecido foliar para as linhagens mutantes obtidas no estudo e linhagem selvagem de <i>Xac</i>	49
Figura 17. Teste de patogenicidade em folhas da laranjeira Baía, realizado <i>in vivo</i> , mostrando o resultado das infiltrações com suspensões dos mutantes à esquerda da nervura central, e à direita a infiltração da linhagem selvagem, crescidos em meio de cultura XVM2, 7 dias após infiltração.....	50
Figura 18. Teste de patogenicidade em folhas da laranjeira Baía, realizado <i>in vitro</i> , mostrando o resultado das infiltrações com suspensões dos mutantes à esquerda da nervura central, e à direita a infiltração da linhagem selvagem, crescidos em meio de cultura XVM2, 14 dias após infiltração.....	51
Figura 19. Teste de patogenicidade em folhas da laranjeira Baía, realizado <i>in vitro</i> , observado em lupa com sistema de vídeo acoplado, mostrando o resultado das infiltrações com suspensões da linhagem selvagem, crescidos em meio de cultura XVM2, em diferentes dias após infiltração.....	52

LISTA DE FIGURAS DO ANEXO

Figura 1A. Representação esquemática do cassete de marca de seleção do *transposon* EZ::TN <KAN-2> presente no complexo que compreende também associação com a enzima “EZ::TN transposase” (Epicentre Technologies, Madison, Wis.).....88

Figura 2A. Gel de agarose a 0,8% com os fragmentos amplificados de ORFs anotadas como para “degradação de parede celular”. **A.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: XAC0028; 2: XAC0029; 3: XAC0030; 4: XAC0168; 5: XAC2986; 6: XAC3076; 7: XAC3516; 8: XAC3562; **B.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: XAC0612; 2 e 3: XAC0661; 4: XAC2522; **C.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: XAC4231; **D.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: DNA de lambda (10 ng); 2: XAC0143; 3: XAC0346; 4: XAC1770; 5: XAC1793; 6: XAC2373; 7: XAC3076.....89

Figura 3A. Gel de agarose (0,8%) com os fragmentos (amplificados/digeridos) de ORFs anotadas como para “degradação de parede celular”. **A.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: *amplicon* de XAC0612; 2: *amplicon* de XAC0612 digerido com *EcoRI*; 3: *amplicon* de XAC2522; 4: *amplicon* de XAC2522 digerido com *PstI*; 5: *amplicon* de XAC3516; 6: *amplicon* de XAC3516 digerido com *SalI*; M: Marcador 1 Kb Plus DNA; **B.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: DNA de lambda (10ng); 2: DNA de lambda (50ng); 3: *amplicon* de XAC2374; 4: *amplicon* de XAC2374 digerido com *SmaI*.....89

Figura 4A. Mapa do plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO.....90

Figura 5A. Gel de agarose (0,8%) da minipreparação de DNA dos fragmentos sub-clonados no plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO de ORFs anotadas como para “degradação de parede celular”. M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: DNA de lambda (10ng); 2: XAC0028; 3: XAC0029; 4: XAC0030; 5: XAC0143; 6: XAC0168; 7: XAC0346; 8: XAC0661; 9: XAC1770; 10: XAC1793; 11: XAC2373; 12: XAC2986; 13: XAC3076; 14: XAC3562; 15: XAC4231.90

Figura 6A. Gel de agarose (0,8%) com amostras de minipreparação de alguns dos fragmentos sub-clonados no plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO clivados com a endonuclease de restrição *EcoRI*. **A.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1, 2 e 3: 10µL 0030; **B.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1 e 2: 10µL XAC1770; 3 e 4: 10µL XAC2986; **C.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1 e 2: 10µL XAC4231.91

Figura 7A. Mapa físico dos vetores pK**mob*GII. O asterisco simboliza que tal construção representa tanto o plasmídeo 18 quanto o 19.....91

Figura 8A. Gel de agarose (0,8%) com DNA do plasmídeo pk18*mob*GUSII. **A.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: DNA de lambda (10ng); 2 e 3: DNA plasmidial. **B.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: DNA de lambda (5ng); 2: DNA de lambda (10ng); 3: DNA plasmidial purificado, quantificado e clivado pela enzima de restrição *Eco*RI; **C.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: DNA plasmidial purificado, quantificado e clivado pela enzima de restrição *Pst*I; 2: DNA plasmidial purificado, quantificado e clivado pela enzima de restrição *Sal*I; **D.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1 e 2: DNA plasmidial purificado, quantificado e clivado pela enzima de restrição *Sma*I.....92

Figura 9A. Gel de agarose (0,8%) do minipreparação de DNA dos fragmentos clonados no plasmídeo pk18*mob*GUSII. **A.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: XAC0030, 2: XAC0143, 3: XAC2373, 4: XAC2522, 5: XAC1770, 6: XAC3076; **B.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA, 1: DNA de lambda (10ng); 2: DNA de lambda (50ng); 3: XAC0028, 4: XAC0029, 5: XAC0168, 6: XAC0661, 7: XAC1793, 8: XAC2374; **C.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: DNA de lambda (50ng), 2: XAC3516, 3: XAC3562, 4: XAC4231; **D.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: XAC0346; 2: XAC0612; 3: XAC2986.....92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens bacterianas e plasmídeos.....	25
Tabela 2. ORFs identificadas no genoma de <i>Xac</i> 306, anotadas como diretamente envolvidas na degradação de parede celular e homologia com organismos representativos.....	29
Tabela 3. <i>Primers</i> desenvolvidos para ORFs identificadas no genoma de <i>Xac</i> 306, anotadas como diretamente envolvidas na degradação de celulose.....	30
Tabela 4. Sequências de leitura aberta (ORFs) identificadas no genoma de <i>Xac</i> e anotadas como diretamente envolvidas na degradação de parede celular, tamanho original e tamanho obtido após a amplificação.....	39
Tabela 5. ORFs identificadas no genoma de <i>Xac</i> 306, anotadas como diretamente envolvidas na degradação de parede celular e homologia com outras espécies de <i>Xanthomonas</i>	57

Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. citri

Resumo

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (*Xac*), é responsável por consideráveis prejuízos para a produção de laranja, no Brasil e no mundo. A doença é altamente agressiva para a planta de citros, provocando, entre outros, lesões em folhas e frutos, com redução tanto na qualidade de frutos quanto na produtividade. Devido à sua importância, recentemente a bactéria teve seu genoma completamente seqüenciado, onde foram identificados, por homologia de seqüência de proteínas, várias ORFs ("open reading frames") associadas ao processo de infecção. Dentre elas, várias seqüências que teoricamente codificam para proteínas envolvidas na degradação da parede celular vegetal, o que pode ser um indicativo de que a bactéria utiliza mecanismos relacionados a este evento durante o seu processo infeccioso e de adaptação. Entretanto, não há até o momento informação experimental a respeito da funcionalidade de seqüências em *Xac* que permitam a degradação da parede celular. O objetivo principal deste trabalho foi identificar funcionalmente, em *Xac*, através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, genes envolvidos na produção ou transporte de proteínas relacionadas à degradação de celulose e com isso analisar a sua relevância na capacidade infectiva ou adaptativa da bactéria. Para tal, foram produzidos mutantes a partir de inserções aleatórias de *transposon* e sítio-dirigidas, estabelecendo-se uma coleção de linhagens, cujo fenótipo e genótipo foram avaliados por ensaios biológicos e seqüenciamento. Verificou-se que o *operon xps* do sistema de secreção do tipo II é funcional em *Xac* e que os genes XAC0028, XAC0029, XAC2374, XAC3516 e XAC4231 participam da degradação de celulose.

Functional analysis of genes for degradation of cellulose in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Abstract

The citrus canker, caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), is responsible for considerable losses for the orange production, in Brazil and abroad. The disease is highly aggressive for citrus plants, resulting, among others, in injuries on leaves and fruits, with a reduction in the quality of fruits as much as in the productivity. Due to its importance, recently the bacterium had its genome completely sequenced and a number of open reading frames (ORFs) were identified by homology with protein sequences and annotated as associated to the infection process. Amongst them, some sequences that theoretically code for proteins involved in the degradation of the plant cell wall, which may indicate that the bacterium uses mechanisms related to this event during the process of adaptation and infection. However, there is no experimental data regarding such sequences to prove their real function during the pathogenesis of *Xac*. The main objective of this work was to identify functionally, in *Xac*, through *in vitro* and *in vivo* assays, genes involved in the production or transport of proteins related to the degradation of cellulose and, therefore, to analyze its relevance in the capacity of adaptation and infection of the bacterium. During the investigation, a collection of mutant strains of *Xac* was produced by random and site-directed mutagenesis, which were analyzed through the identification of leaf lesions and their action on degradation of artificial cellulose in plate as well as the growth in leaves. Through tests of mutagenesis and *in vitro* assays, this study shows that the *xps operon* that is present in *Xac* and encodes a type II secretion system machinery is functional and the genes XAC0028, XAC0029, XAC2374, XAC3516 and XAC4231 participate in cellulose degradation. In summary, for the first time it was experimentally demonstrated that *Xac* is capable in hydrolizing cellulose.

1. INTRODUÇÃO

A produção de citros está entre as principais atividades do agronegócio brasileiro, com um volume anual de cerca de 1,5 bilhão de dólares em exportações de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC) e movimenta, por ano, 5 bilhões de reais, representando a segunda atividade rural em importância no Estado de São Paulo, menor apenas que a cana-de-açúcar (SAA, 2006). Como consequência, tem permitido a geração de milhares de empregos diretos e indiretos no Brasil.

Por outro lado, o cultivo de citros apresenta uma série de problemas relacionados à questão fitossanitária o que em alguns casos, inclusive, pode servir como argumento na imposição de barreiras não-tarifárias por países importadores. Essa imposição tornou-se ainda mais rigorosa após o Fundecitrus e a Secretaria de Agricultura Paulista detectarem, depois de dez anos de inspeção, o primeiro caso de cancro cítrico em viveiros telados no Estado de São Paulo, no final de 2005. A hipótese mais provável é que houve descuido ou introdução de material não autorizado no viveiro, contrariando as normas vigentes de produção de mudas cítricas. O Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus) rastreou, identificou e inspecionou 32 viveiros e 56 pomares em 23 municípios paulistas que receberam material do viveiro contaminado, com o objetivo de identificar qualquer possibilidade de disseminação de mudas contaminadas. Até então, a doença só havia sido verificada em pomares abertos. Como se trata de um caso inédito, os pesquisadores estão identificando aos poucos como a bactéria se comporta nesses ambientes. Foram encontradas poucas plantas e sempre com sintomas iniciais, devido à redução de respingos em função da irrigação localizada, mas uma vez no campo, em condições favoráveis, a doença se manifesta e contamina as plantas a sua volta (Fundecitrus, 2006).

O cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), tem recebido particular atenção da cadeia produtiva por ser responsável por 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 da bactéria por furacões (Irey et al., 2005). A bactéria é altamente agressiva para a planta de citros, provocando lesões principalmente em folhas, frutos e ramos. O sintoma típico, observado principalmente nas folhas e

frutos, é a formação de lesões em forma de cratera com as margens apresentando coloração amarelada e centro escuro. Notoriamente, a doença apresenta controle difícil e de alto custo, sobretudo por ser a erradicação de plantas seguida de queima a principal prática em áreas com infecção, o que, além disso, não representa necessariamente pleno controle da doença (Graham et al., 2004).

Devido à sua importância econômica, recentemente a bactéria teve seu genoma completamente sequenciado (da Silva et al., 2002), onde foram identificados, por homologia de sequência de proteínas, várias ORFs ("open reading frames") associadas ao processo de infecção, sobrevivência e favorecimento da sua capacidade de causar a doença na planta de citros, inclusive sequências altamente relacionadas com a degradação de parede celular de plantas hospedeiras.

Em função do tipo de lesão causada pela bactéria, pode-se supor que *Xac* apresente capacidade de degradar compostos da parede celular do hospedeiro e que esta propriedade pode atuar na adaptação do fitopatógeno à planta de citros (Figura 1). Com isso, há a possibilidade de uso da informação gerada a partir deste estudo na formulação de alternativas no manejo da doença como, por exemplo, a identificação futura de condições em que tais fatores de virulência, comprovadamente funcionais, sejam expressos durante a interação com a planta.

O objetivo do presente trabalho foi identificar funcionalmente, em *Xac*, genes envolvidos na produção ou transporte de proteínas relacionadas à degradação de celulose de folhas de plantas de citros e investigar sua relevância na capacidade infectiva ou adaptativa da bactéria.

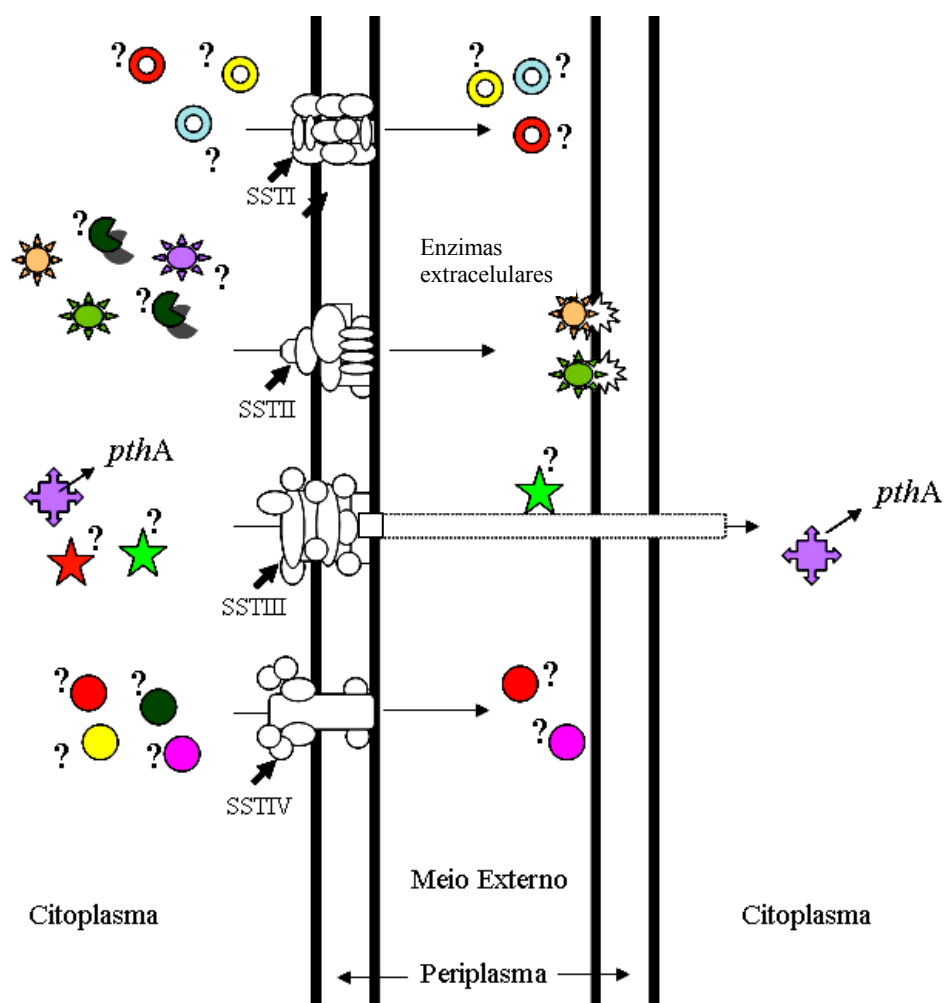


Figura 1. Esquematização dos sistemas de secreção tipos I (SSTI), II (SSTII), III (SSTIII) e IV (SSTIV) e representação da passagem de produtos do citoplasma bacteriano para o meio externo e para células da planta hospedeira.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A cultura dos citros

As plantas de citros (família Rutaceae) são originárias das regiões úmidas tropicais e subtropicais do continente asiático e ilhas adjacentes, tendo sido levadas para os países europeus há séculos (Mattos Junior et al., 2005). A laranja espalhou-se pelo mundo, sofrendo mutações e dando origem a novas variedades. O cultivo de sementes modificou aleatoriamente o sabor, o aroma, a cor e o tamanho dos frutos (Hasse, 1987). Atualmente, os pomares mais produtivos, resultantes de uma citricultura estruturada, estão nas regiões de clima tropical e sub-tropical, destacando-se o Brasil, Estados Unidos, Espanha, México, China e África do Sul, sendo que o Estado de São Paulo e a Flórida são as principais regiões produtoras do mundo (Hasse, 1987).

Com mais de 800 mil hectares de plantas de citros em seu território, o Brasil tornou-se, a partir da década de 80, o maior produtor mundial (o que corresponde a cerca de 29% da produção mundial de laranja) seguido pelos Estados Unidos, além de maior exportador de suco de laranja concentrado e congelado (SLCC), com cerca de 57,6% do volume de suco produzido no mundo (FAO, 2006). Dessa forma, é hoje o maior produtor mundial de laranja, sendo o Estado de São Paulo responsável pela maior parte da produção nacional, com um volume que supera 327 milhões de caixas de 40,8 Kg (IEA, 2005).

A análise do desempenho exportador da cadeia citrícola brasileira revela sua importância na economia do País. Tomando-se todos os produtos exportáveis da citricultura nacional, em que predomina o suco concentrado de laranja com mais de 80% das divisas geradas, verifica-se, ainda, a importância do farelo de polpa cítrica e do óleo essencial e, em menor escala, da laranja fresca, produto que sofre inúmeras restrições, quer através das variedades cultivadas como também através das diversas barreiras tarifárias, principalmente as técnicas e as fitossanitárias, que impedem o acesso das frutas brasileiras a estes mercados (Neves et al., 2001).

Face à importância do suco concentrado na pauta das exportações, a coordenação da cadeia citrícola repousa na indústria de processamento, que administra o fluxo exportador de forma organizada e monitorada por uma exportação concentrada em poucas empresas, caracterizando um oligopólio (em 2000, apenas duas empresas citrícolas responderam por mais de 55 % do valor total das exportações do País). Estas

informações evidenciam, ainda, a valorização da fruticultura nacional, elevada pelo excelente desempenho exportador da citricultura, que vem superando US\$ 1 bilhão por ano, agregando valor à economia do País e servindo de exemplo para as demais frutas (Neves et al., 2001).

Apesar dessa grande produção obtida, da alta tecnologia empregada, do montante expressivo de divisas gerado e da enorme quantidade de empregos diretos e indiretos, a lucratividade do setor seria ainda maior caso as perdas devido ao ataque de patógenos não apresentassem tamanha magnitude. O histórico de doenças da cultura é bastante variado e apresenta-se em constante crescimento. Somente nas últimas três décadas foram adicionadas a estas, doenças como a pinta preta, a clorose variegada dos citros, a morte súbita dos citros e o huanglongbing (ex-greening), unindo-se às mais antigas, mas não menos preocupantes, como cancro cítrico, leprose, tristeza, declínio, gomose, sorose, exocorte e xiloporose.

Em 2005, das 170.165 plantas encontradas com cancro cítrico, 82,5% estavam em áreas não comerciais. Nos pomares comerciais, foram encontrados menos talhões contaminados do que em 2004. O balanço do Fundecitrus aponta também baixo índice da doença nesses talhões: 64% tinham menos de 0,5% de contaminação, indicando que a detecção foi ágil e evitando a eliminação total do talhão. Em pomares comerciais, foram encontradas 12.394 árvores doentes, 7,5% do total. Os quintais foram os responsáveis pelo maior número de plantas contaminadas em 2005. No Estado de São Paulo, a região mais afetada continua sendo a Noroeste, com cerca de metade das árvores erradicadas. Em segundo lugar, o Centro, seguido do Norte. A região Sul também apresentou contaminação de cancro cítrico, mas com incidência baixa. Em vista disso, uma ação importante no combate ao cancro cítrico em 2005 foi a intensificação das inspeções em quintais e residências urbanas (Fundecitrus, 2006).

O aparecimento de doenças, embora represente obstáculo a ser superado, tem motivado o desenvolvimento de pesquisas de grande impacto, capazes de gerarem potenciais medidas para o controle destas doenças e de outras que venham a surgir, propiciando um manejo cada vez mais racional e lucrativo da cultura.

2.2. O cancro cítrico

O cancro cítrico é considerado como uma das mais importantes doenças que ameaçam a produção da citricultura, causado pela bactéria *X. axonopodis* pv. citri, cujas

ações de sanidade vegetal vêm merecendo contínua atenção dos governos estaduais, municipais e federal, bem como das entidades privadas do setor (Rodrigues Neto e Ribeiro, 2002).

O cancro ocorre nos citros e em seus aparentados, afetando diversas variedades de importância comercial, tais como laranjas, limões, limas e pomelos, entre outros (Amaral et al., 2003). Na década de 50, o agente do cancro cítrico foi detectado no Brasil, provavelmente introduzido por meio de mudas trazidas clandestinamente do Japão (Hasse, 1987). Na tentativa de erradicar o patógeno, o Ministério da Agricultura criou a Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC). Até os dias de hoje, milhares de plantas são destruídas anualmente, imediatamente à identificação de um foco da doença. Em fevereiro de 2006, já se sabe que pelo menos 44.000 mudas oriundas de viveiro foram erradicadas pela Secretaria de Agricultura Paulista (Abracen, 2006).

Causado por uma bactéria bastante agressiva e de rápida disseminação, o cancro está presente em pomares de citros de várias partes do mundo, o que inclui países líderes na produção de laranja para a indústria de suco, como o Brasil e os Estados Unidos. Embora no Estado de São Paulo os primeiros relatos da doença no território brasileiro tenham ocorrido na década de 50 (Bitancourt, 1957), até os tempos atuais, a doença tem ressurgido nos pomares e provocado a implementação de medidas legais rígidas para o seu controle. Além da produção de frutos para suco, as exportações de frutos frescos também ficam comprometidas, fazendo com que as importações sejam realizadas mediante uma série de exigências.

O Brasil, desde a 11ª reunião do Grupo de Trabalho Permanente em Quarentena Vegetal (Montevideu, Uruguai, junho de 1995), classifica o cancro cítrico como “Praga Quarentenária A2” (Rodrigues Neto e Ribeiro, 2002), ou seja, a “praga” está presente no país ou região, sendo limitada a uma determinada área (oficialmente controlada). Além disso, os governos municipais, estaduais e federal têm promovido ações conjuntas de defesa e inspeção vegetal com a finalidade de prevenir a entrada da doença e controlar a sua disseminação, pela interdição de propriedades com contaminação e eliminação de plantas doentes.

Embora os principais sintomas da doença nos citros sejam observados nas folhas e nos frutos, todos os órgãos aéreos da planta são afetados (Figura 2), principalmente quando há ocorrência de quaisquer aberturas ou ferimentos no tecido vegetal, provenientes de orifícios naturais como os estômatos, ou causadas por danos físicos

como o rasgamento das folhas ou perfurações provocadas por espinhos da própria planta. Nas folhas, os sinais iniciais ocorrem com a formação de pequenas pústulas circulares e oleosas, com até 1 mm de diâmetro, na superfície abaxial. Esta região é particularmente importante no processo de infecção, pois contém a maior concentração de estômatos, constituindo a principal via de acesso da bactéria. Com o tempo, a lesão aumenta de tamanho e forma pústulas na forma de erupções com relevo áspero e de coloração marrom no seu interior e um halo circundante de cor amarela que, no entanto, pode desaparecer (Amaral, 2003).

O cancro em si, que é a principal manifestação da doença, é causado pela excessiva divisão celular (hiperplasia) no mesófilo foliar onde houve a infecção, provocando o rompimento da epiderme e seu surgimento em forma de erupção, no centro da lesão. Durante todo o processo, a região correspondente à lesão no lado oposto da folha (superfície abaxial) também apresenta as mesmas alterações de textura e de coloração descritas. Curiosamente, enquanto nos frutos as lesões se assemelham bastante àquelas que ocorrem nas folhas, nos ramos elas tendem a apresentar coalescência, ou seja, agrupam-se formando lesões de formato irregular e com maior extensão, além de não apresentarem nítida formação do halo amarelo (Amaral, 2003).



Figura 2. Danos causados em plantas de citros pela incidência de cancro cítrico. **A.** Fruto e folhas maduros; **B.** Frutos jovens; **C e D.** Ramo de folhas de laranja doce; **E.** Folha isolada; **E₁** superfície foliar abaxial; **E₂** superfície adaxial; **F.** Caule; **G e H.** Erradicação dos focos da doença em pomares (Fonte: A, B, E₁, E₂, F e H - Schubert et al., 2001; C, D, E - A. M. do Amaral; G - Fundecitrus).

2.3. A bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

A bactéria *Xanthomonas axonopodis* Starr & Garces emend. Vauterin, et al. pv. *citri* (Hasse) Dye [syn. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye] pertence à classe gamma de Proteobactérias. É uma bactéria Gram negativa, baciliforme, monotríquia e aeróbia, possui dois plasmídeos e um cromossomo e não forma esporos (Figura 3a). O isolamento em placa de Petri com o meio de cultivo Ágar Nutriente (5,0g de Peptona;

3,0g de Extrato de carne; 1,0g de Cloreto de sódio; 18,0g de Agar) permite observar claramente a coloração amarelo-alaranjada das colônias, típicas do gênero (Figura 3b).

A bactéria desenvolve-se adequadamente em temperaturas em torno de 28 °C e não é capaz de sobreviver por longos períodos em solo, em ervas invasoras ou em restos de cultura. Em ausência de plantas de citros, há um rápido declínio na população da bactéria em solos. Entretanto, a bactéria pode sobreviver por longo tempo em tecidos desidratados. Exsudatos bacterianos são produzidos sem presença de um filme d'água sobre as lesões. A disseminação a curtas distâncias dá-se, principalmente, por chuvas e ventos. A bactéria penetra em tecidos novos por estômatos e aberturas naturais ou por ferimentos produzidos por espinhos, insetos, etc. (Kimati et al., 1997).

Provavelmente oriundo dos mesmos centros de origem dos citros, ou seja, sul da China, Indonésia e Índia, o cancro cítrico ocorre em quase todo o mundo, o que inclui a América do Sul, Estados Unidos, Japão, Nova Zelândia, África, entre outros (Goto, 1992). Embora não haja ainda consenso mundial quanto à sua taxonomia, a classificação corrente tem considerado três “tipos” ou patovares diferentes de cancro: A, B e C. O cancro tipo A, ou cancro cítrico asiático, é o principal e mais severo tipo presente nos pomares e é causado pela *Xac*. O tipo B, cancrose B ou “falso cancro”, tem como principal hospedeiro o limão Galego, podendo ocorrer em laranja Azeda, entre outros, e é restrito à Argentina, ao Paraguai e ao Uruguai. O tipo C, cancrose C ou “cancro do limão Galego”, infecta somente o limoeiro Galego e está restrito ao Brasil. Atualmente, as patovares que causam os tipos B e C são denominadas *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* (Rodrigues Neto e Ribeiro, 2002).

Há também uma reclassificação feita sobre as cinco formas da doença descrita como cancro, classificada de acordo com os patovares: patovar citri (“A”), *aurantifolii* (“B/C/D”) e citrumelo (“E”) de uma simples espécie de *Xanthomonas campestris* pv. citri (ou *X. axonopodis* pv. citri). Com a finalidade de determinar o nível de parentesco taxonômico entre as espécies de *Xanthomonas campestris* pv. citri, usando-se 44 espécies representativas das cinco formas reconhecidas como causadoras do cancro cítrico mostrou-se que cada taxon pode ser diferenciado pela severidade e patogenicidade. Dessa forma as taxa I, II e III das espécies de citrus foram nomeadas, respectivamente, *Xanthomonas smithii* subsp. citri (ex Hasse, 1915) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel et al., 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., e *Xanthomonas alfalfae* subsp. citrumelo (ex Riker and Jones Gabriel et al., 1989 nov. rev. comb. nov.. Adicionalmente, novas análises propuseram a

reclassificação de *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith, 1901) Dye 1978 como *X. smithii* subsp. *smithii* sp. nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones) Dye 1978 como *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nov. rev.; e "var. *fuscans*" (ex Burkholder 1930) de *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1897) como *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. (Schaad et al., 2005).

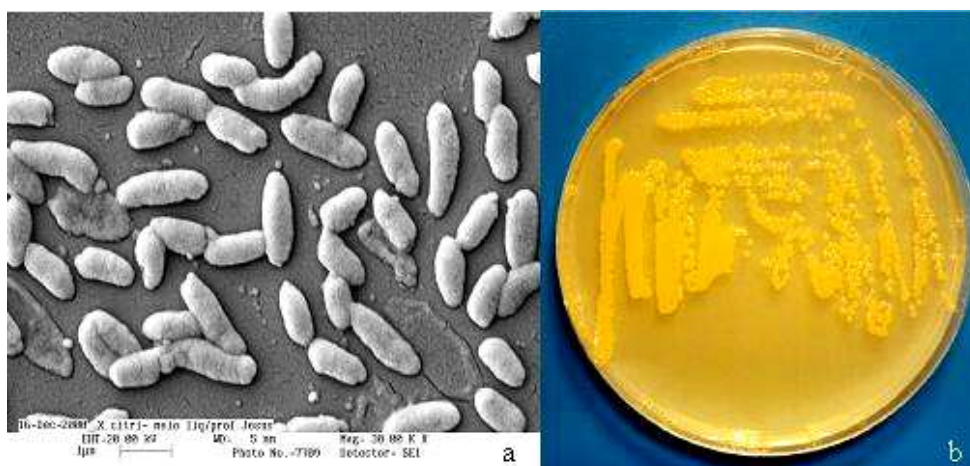


Figura 3. Aspecto visual de células e colônias de *Xac*. **(a)** Microscopia eletrônica e **(b)** colônias em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Nutriente (Fonte: E. Kitajima e A. M. do Amaral).

2.4. Disseminação e sobrevivência de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

A bactéria *Xac* apresenta uma série de peculiaridades quanto à sua capacidade de disseminação, sobrevivência e virulência. Ela sobrevive na margem das lesões que provoca, mas, no entanto, morre rapidamente quando exposta diretamente à luz do sol e/ou ao dessecamento na superfície do órgão vegetal. A sua sobrevivência é de apenas alguns dias quando presente no solo e de alguns meses quando incorporada juntamente com o tecido vegetal no solo, possivelmente devido à competição com organismos saprofíticos. A bactéria pode sobreviver por vários anos em tecidos vegetais que se apresentam dessecados e livres de solo (Goto, 1992). Entretanto, a principal fonte de inóculo é, sem dúvida, a resultante da erupção das pústulas foliares (Davies e Albrigo, 1994). Já em condições abaixo das ideais os primeiros sintomas podem ocorrer até mais de 60 dias após a inoculação (Goto, 1992).

A bactéria *Xac* afeta particularmente órgãos em estágios de pleno crescimento, sobretudo durante período com alta umidade e temperatura em torno de 28 °C, o que

torna os climas tropicais e sub-tropicais, ou seja, os ambientes predominantes da citricultura mundial, inclusive do Brasil, altamente favoráveis à sobrevivência da bactéria (Timmer et al., 2000; Pruvost et al., 2002; Vernière et al., 2003). Basicamente, folhas e ramos são mais suscetíveis à doença nas seis primeiras semanas após o início do crescimento, enquanto os frutos, 90 dias após a queda das pétalas (Timmer et al., 2000). Após esta fase, a planta apresenta maior facilidade em resistir à infecção.

Com a introdução no território brasileiro da larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton) os danos causados pela doença são ainda maiores, pois o inseto, que durante a fase larval forma galerias no mesófilo foliar, facilita a penetração da bactéria. Até o momento, não há descrição de vetor capaz de transportar a bactéria do cancro cítrico e provocar a doença em plantas (Belasque Júnior, 2005).

As variedades que apresentam prolongado crescimento vegetativo, com a formação contínua de tecidos jovens, são particularmente mais suscetíveis. A bactéria é capaz de causar a doença em uma vasta diversidade de espécies de citros e, principalmente, nas variedades de laranjas doces, Baianinha e Hamlin, limão Galego e pomelos (Amaral, 2003).

A infecção primária pela bactéria ocorre nas brotações novas, sendo provida por células bacterianas presentes em lesões velhas nas folhas e nos ramos de plantas doentes. Por ocasião de períodos chuvosos, a bactéria exsuda de lesões velhas, atingindo os tecidos imaturos, altamente suscetíveis, induzindo a formação das lesões de cancro. Além da diminuição da superfície foliar, o ataque do cancro cítrico na planta leva à queda de frutos, mesmo quando pequenos, ou então à presença de rachaduras nas cascas, por onde penetram agentes secundários causadores de podridões, resultando na sua queda e prejudicando a sua aceitação para o consumo. Localmente, o cancro cítrico é disseminado por meio de chuva e ventos, água de irrigação, equipamentos contaminados e insetos e, à longa distância, pelo transporte de mudas, ferramentas, roupas, veículos contaminados. Assim como a maioria das doenças bacterianas de plantas, o cancro é altamente influenciado pelas condições ambientais de umidade e temperatura, além da idade e variedade cítrica. Ainda, o desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas ao redor de 28 °C e chuvas pesadas, onde a infecção pode se tornar extremamente severa (Rodrigues Neto e Ribeiro, 2002).

A principal medida de controle do cancro cítrico é a prevenção, que considera os aspectos ligados à maneira ou circunstância na qual o patógeno pode ser introduzido em uma área e se disseminar. Casos extremos, como a presença de furacões, também são

particularmente importantes em regiões da Flórida (Schubert e Sun, 2003). Para que a entrada do patógeno no local de cultivo seja evitada, sobretudo pela contaminação originada de longas distâncias, várias atividades são realizadas, tais como a desinfestação de material de colheita (sacolas, escadas, caixas, etc...), veículos, ferramentas e vestuário, entre outros, com a instalação de pedilúvios e rodolúvios, além do controle da procedência dos veículos que entram no pomar (Amaral, 2003).

A utilização de quebra-ventos ao redor de área com cultivo de citros é também uma medida bastante incentivada, o que contribui para evitar a dispersão da bactéria através do vento e evita o ferimento das folhas de plantas expostas à corrente de ar predominante. Outra medida interessante é a produção, seleção e plantio de citros tolerantes ao cancro e que tenham reconhecido valor comercial, como as tangerinas Ponkan e Satsuma e algumas variedades de laranja doce, como a 'Folha Murcha', entre outras (Amaral, 2003).

Por outro lado, como medida de caráter curativo, ou seja, o controle após a constatação de que a bactéria já se instalou na planta de citros, duas ações são adotadas atualmente: a erradicação de plantas seguida de queima, como é feito no Estado de São Paulo e na Flórida-EUA (Namekata et al., 1996), ou então o tratamento químico com pulverização de plantas infectadas, com produtos à base de cobre, principalmente na época do surto de crescimento primaveril, como ocorre na Argentina e no Brasil, sobretudo no Estado do Paraná (Stall et al., 1981; Leite Jr., 2000), porém essas medidas, não representam necessariamente pleno controle da doença (Graham et al., 2004).

2.5. Mecanismos de alteração genética induzida em bactérias

O seqüenciamento completo de várias bactérias fitopatogênicas, incluindo *Xac* (da Silva et al., 2002) tem ampliado as possibilidades de estudos sobre genoma funcional. Por outro lado, a utilização de métodos de mutagênese que permitam a descoberta de novos genes envolvidos no processo de degradação de celulose é de grande importância no estudo de fitopatógenos. Com o uso de inserção aleatória de *transposons* há a possibilidade de identificação de seqüências que podem regular a expressão de genes, além de genes que codificam para transportadores e proteínas que compõem a rota metabólica do processo de degradação da parede. A geração de mutantes através de recombinação homóloga (Monteiro et al., 2001; Gaurivaud et al., 2002; Castañeda et al., 2005) e mutagênese aleatória empregando *transposon* (Guilhabert et al., 2001a e b),

permitindo a geração de grande número de mutantes, fornece informações valiosas a respeito da patogenicidade de *Xac*.

O processo de “desligamento” de um gene, ou seja, a formação de um mutante é a principal forma de se iniciar o estudo de sua função. Considerando-se que não haverá a sua expressão no organismo, é possível avaliar-se, ao menos parcialmente, o fenótipo do mutante e o efeito na sobrevivência da bactéria e/ou sua capacidade de infecção da planta.

Dentre os métodos mais relevantes nesse tipo de estudo, há a transformação genética da bactéria, que permite a modificação do organismo, seja pela introdução de novas características, seja pela interrupção (nocaute) de genes presentes em seu genoma.

Nas bactérias, a maneira mais eficiente para a mutação de genes específicos é feita por meio da troca, por recombinação homóloga, da cópia selvagem do gene alvo por uma cópia truncada ou contendo alguma mutação. Os dois principais métodos usados para a ruptura gênica por recombinação homóloga são a mutagenese por inserção-deleção (“IDM” do inglês *Insertion-Duplication Mutagenesis*) e a troca alélica (“AE” do inglês *Alelic Exchange*). A IDM tem sido usada com sucesso em vários organismos como *Mycobacterium smegmatis* (Bauklard et al., 1996), *Neisseria gonorrhoeae* (Hamilton et al., 2001), *Streptococcus pneumoniae* (Lee et al., 1989) e *X. fastidiosa* (Neto et al., 2001; Gaurivaud et al., 2002). A IDM envolve a recombinação homóloga com uma permuta entre o gene selvagem no cromossomo bacteriano e uma cópia truncada desse gene, clonada em um plasmídeo replicativo ou suicida. Após o evento de permuta, todo o plasmídeo fica inserido no cromossomo bacteriano e o gene alvo sofre uma duplicação.

Estudos têm sido realizados recentemente com ênfase na utilização da técnica para a obtenção de mutantes das mais variadas bactérias, incluindo fitopatógenos (Guilhabert et al., 2001a e b; Monteiro et al., 2001; Brumley et al., 2002). Entretanto, mesmo naqueles trabalhos que abordam especificamente o gênero *Xanthomonas* (Shaw e Khan, 1993; White e Gonzalez, 1995), a bactéria causadora do cancro cítrico não tem sido empregada na realização dos testes, o que pode indicar uma maior dificuldade de sucesso no uso da técnica para essa espécie.

Tal aspecto mostrou que, embora a bactéria *Xac* apresente considerável importância econômica na agricultura e laboratórios utilizem a técnica, não havia descrição acessível de metodologia que orientasse a obtenção de mutantes desta

bactéria, especificamente a partir de eletroporação. Baseando-se no fato de que vários outros patovares de *Xanthomonas* são eletro-competentes, pode-se comprovar que a bactéria *Xac* é passível de transformação através do choque elétrico, e definir protocolo e parâmetros adequados para a transformação desse organismo (Amaral et al., 2003).

Dessa forma a transformação passou a ser também, um dos tipos mais simples de transferência de genes, onde a célula receptora adquire genes de moléculas de DNA solúveis no meio. Na natureza, o DNA pode ser proveniente de células mortas que sofreram lise e liberaram seu DNA. No laboratório, entretanto, o DNA é extraído de uma suspensão de bactérias doadoras por métodos químicos e então é adicionado a uma cultura de células receptoras. Somente certas espécies de bactérias podem sofrer transformação, e mesmo estas devem estar em estado de crescimento receptivo para incorporar o DNA doador, isto é, devem ser competentes. Esta condição usualmente ocorre somente quando as bactérias receptoras estão na fase logarítmica tardia do seu crescimento. As células bacterianas competentes produzem uma proteína especial que liga os fragmentos de DNA doador em sítios específicos na superfície celular (Pelczar et al., 1996).

Embora o DNA cromossômico possa ser facilmente transferido para a bactéria receptora competente, o DNA plasmidial não é facilmente transferido por processos de transformação comum, que simplesmente adicionam DNA às células receptoras. Entretanto, procedimentos especiais largamente utilizados na engenharia genética podem ser utilizados para realizar a transformação com DNA plasmidial (Pelczar et al., 1996). Os dois principais procedimentos utilizados para a realização da transformação são: a eletroporação e o choque térmico.

A *eletroporação* é uma técnica na qual se misturam bactérias e o vetor em um único tubo e aplica-se um choque elétrico na mistura, com o objetivo de desestabilizar a membrana e permitir a entrada do vetor na bactéria. Ela é então rapidamente transferida para meio de cultura e incubada à temperatura ideal para a bactéria em questão para que possa se recuperar após o choque (Brasileiro et al., 1998).

A transformação com choque térmico associada ao cloreto de cálcio tem o mesmo objetivo. As bactérias e o vetor são misturados com uma solução de cloreto de cálcio e sofrem um choque térmico. Os íons cálcio têm a função de neutralizar as cargas negativas do DNA e da membrana bacteriana, facilitando a passagem do vetor pela membrana no momento do choque térmico (Brasileiro et al., 1998).

Após a transformação, as bactérias são incubadas em condições adequadas para que possam se multiplicar e, a seguir, plaqueadas em meio sólido, para que colônias possam ser isoladas. A identificação das colônias recombinantes é feita utilizando as características conferidas pelos plasmídeos. Uma vez identificada a bactéria que contém a construção de interesse dentre as várias plaqueadas, basta transferir a colônia para meio líquido para que se obtenha milhões de cópias da bactéria e, conseqüentemente, da construção (Brasileiro et al., 1998).

2.6. A genômica e a biologia de fitopatógenos

A grande diversidade de bactérias que causam doenças em plantas, incluindo espécies Gram-positivas e negativas, o elevado número de patovares e raças, tornam árdua a tarefa de descrever os mecanismos de patogenicidade e virulência nas bactérias fitopatogênicas. Estas bactérias pertencem majoritariamente aos gêneros *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Leifsonia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* e *Xylella*. A sintomatologia observada, como murcha, podridão, amarelecimento, cancro, necrose, manchas foliares e tumores é característica do patossistema em questão e representa o resultado da interação dos mecanismos de patogenicidade da bactéria e as defesas da planta.

A identificação de proteínas direta ou indiretamente relacionadas com o processo de patogênese é de suma importância para o entendimento de uma doença. Com o uso de recursos da genômica, tais proteínas têm sido caracterizadas e auxiliado no estudo da colonização do hospedeiro (Brumbley et al., 2004; Cho et al., 2006). No caso de bactérias fitopatogênicas, proteínas que de alguma forma auxiliam na interação da bactéria com a planta, ou seja, “proteínas efetoras”, estão fortemente relacionadas com o sucesso da infecção (DebRoy et al., 2004; Minsavage et al., 2004). Também a degradação da parede celular de plantas hospedeiras parece, em muitos casos, ser um dos principais mecanismos de interação com a planta e, conseqüentemente, com a colonização do tecido (Toth et al., 2003).

A análise genômica associada à análise biológica de potenciais genes envolvidos com a infecção bacteriana, como aqueles que provocam a adaptação da bactéria na superfície foliar e a secreção de proteínas que causam diretamente a lesão, tem auxiliado o entendimento da virulência de vários fitopatógenos (Okinaka et al., 2002; Gaurivaud et al., 2002). Além disso, há o incentivo da exploração dos dados disponíveis com o uso

de ferramentas úteis na análise biológica como a mutação genética (Thanassi et al., 2002; Young e Dong, 2003) para identificação de genes que codificam, por exemplo, para enzimas que degradam componentes da parede celular (Matsumoto et al., 2003).

No caso do cancro cítrico, embora durante a anotação do genoma da bactéria tenham sido encontradas várias seqüências homólogas a genes envolvidos no processo, o que sugere alguma função na bactéria, não há ainda informação da relevância ou funcionalidade de tais proteínas no processo de colonização, embora cada vez mais seja indicada a possibilidade destas enzimas funcionarem no processo de virulência (Jha et al., 2005; Liu et al., 2005).

Dentre as seqüências identificadas no genoma da bactéria causadora do cancro cítrico, algumas apresentaram homologia com genes associados à degradação da parede celular de outras plantas hospedeiras. Adicionalmente, cerca de 1/3 de todas as seqüências identificadas na bactéria não apresentam função determinada, o que pode também significar novas perspectivas de maior número de genes relacionados à função em questão.

Adicionalmente, foram localizadas seqüências que codificariam para proteínas envolvidas no transporte de macromoléculas em várias bactérias Gram-negativas e que são classificadas com base em sua função e homologia, o que inclui os sistemas de secreção do tipo I, II, III e IV.

O sistema de secreção do tipo III é responsável, dentre outros mecanismos, pela “injeção” no hospedeiro de grande parte das proteínas associadas ao processo de infecção, o que inclui proteínas de avirulência e, por isso, está intimamente ligado à doença em plantas suscetíveis ou ao “disparo” do mecanismo de resistência em plantas resistentes, normalmente denominado de “hipersensibilidade” (Lim e Kunkel, 2004; Minsavage et al., 2004). Em recente estudo em *X. oryzae* pv. *oryzae* sobre o papel de um regulador gênico (HrpXo) no sistema de secreção do tipo III, foi detectada também a regulação, por este mesmo fator, da secreção da enzima protease de cisteína, que é secretada pelo sistema de secreção do tipo II, o que indica uma interação entre estes dois sistemas (Furutani et al., 2004).

O sistema de secreção tipo II é usado por várias bactérias patogênicas Gram-negativas, para a secreção de proteínas extracelular (Pugsley, 1993; Russel, 1998; Salmond et al., 1993). Ele é um mecanismo *sec*-dependente, ou seja, permite a secreção de proteínas do citosol para o exterior da célula, em duas fases. Na primeira fase, as proteínas são transportadas do interior da célula bacteriana (citoplasma) para o

periplasma (espaço entre as membranas interna e externa) por enzimas codificadas pelos genes *sec*. Em seguida, na segunda fase, as proteínas são secretadas do periplasma para o meio extracelular, atravessando a membrana externa através de uma abertura formada pelo sistema tipo II (Ball et al., 1999; Hu et al., 2002). Trabalhos recentes mostram o papel fundamental do sistema de secreção tipo II durante a patogênese (Jha et al., 2005), pois na segunda fase desse sistema são necessários pelo menos 14 genes para que o processo se complete (Lee et al., 2001).

Proteínas associadas com degradação de parede celular, virulência e adaptação, tais como celulases, pectato liases, toxinas, proteases e fosfatases alcalinas estão entre os principais compostos liberados para o meio externo através do sistema de secreção do tipo II de bactérias fitopatogênicas (Russell, 1998). Normalmente, este sistema é composto de 12 membros, denominados XcpA e XcpP a -Z, e desempenha funções importantes na adaptação do patógeno ao hospedeiro e ao ambiente, tanto em mamíferos quanto em plantas (Sandkvist, 2001). Em *Vibrio cholerae* o mecanismo de secreção de fatores de virulência tais como a toxina do cólera e hemaglutininas/proteases é mediado pelo sistema de secreção tipo II (Scott et al., 2001).

Embora toxinas também possam ser secretadas, o sistema tipo II é basicamente envolvido com a secreção de enzimas de degradação. Proteínas secretadas por este sistema incluem também as enzimas celulase de *Erwinia*, elastase e fosfolipase C de *P. aeruginosa*, enzimas amilase e protease de *Aeromonas hydrophila* e quitinase e protease de *V. cholerae*, além da toxina do cólera (Hacker e Kaper, 2000).

Durante ensaio com o desligamento do sistema de secreção tipo II em *X. oryzae* pv. *oryzae*, foi demonstrado que linhagens com ausência de funcionalidade deste mecanismo apresentam deficiência em causar doença em arroz, além de não secretar xilanase, uma enzima que em alguns fitopatógenos exerce função na virulência (Suvendra et al., 2000).

A hidrólise da pectina da parede celular de plantas é um mecanismo notório de virulência de vários fitopatógenos, especialmente para as espécies de *Erwinia*. Caracteristicamente, tais espécies causam a destruição drástica do tecido vegetal devido a uma massiva degradação da parede celular (Shevchik e Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2003). Na espécie *E. chrysanthemi*, o sistema de secreção do tipo II é responsável pela liberação de várias enzimas degradadoras da parede celular (Herron et al., 2000). Em *E. carotovora* subsp. *carotovora*, uma celulase secretada (CelV) é um dos principais fatores de virulência da doença durante o processo infeccioso e sofre controle pós-

transcrição através do gene *rsmA*, que codifica para proteína que se liga ao RNA, modulando a sua expressão (Cui et al., 2001).

Embora a patogenicidade e virulência de *Xac* estejam altamente associadas com a atividade de um simples gene de avirulência (*pthA*) (Swarup et al., 1991; Swarup et al., 1992; De Feyter et al., 1993; Kanamori et al., 1998), pouco se sabe a respeito dos demais produtos gênicos envolvidos nesse processo. O estudo da transcrição desses genes sob condições naturais seria uma boa alternativa para identificar todos os elementos envolvidos na patogenicidade e virulência deste patógeno.

O estudo de atividade de degradação de celulose por bactérias tem sido consideravelmente facilitado pelo uso de ensaios que auxiliam na manipulação da bactéria e identificação rápida de proteínas relacionadas. Dentre estes recursos está a carboximetil celulose (CMC), um composto celulósico que, ao contrário da celulose, é solúvel em água, o que permite seu uso como substrato nos testes de degradação (Zorreguieta et al., 2000; Zhou e Ingram, 2000; Zhou et al., 2001; Lynd et al., 2003). O cultivo de bactérias em placa de Petri e teste de atividade enzimática através da degradação de CMC, com medição de zona de celulose degradada em gel com corante (Chatterjee et al., 1995; Spiridonov e Wilson, 2000), é amplamente utilizado para identificação e comparação de atividade enzimática de proteínas envolvidas neste processo (Chatterjee et al., 2002; Murashima et al., 2003). Este ensaio tem sido utilizado para a avaliação de microrganismos celulolíticos e suas enzimas (Teather & Wood, 1982).

Dessa forma, esse sistema alternativo foi adotado para identificar a capacidade de degradação do composto carboximetil celulose (CMC) usando meios seletivos de cultura, entre eles, o XVM2, que induz a expressão de genes *hrp* essenciais na interação com a planta, seja na patogenicidade em plantas suscetíveis ou na indução da reação de hipersensibilidade (HR), em plantas resistentes (Astua-Monge et al., 2000; Schulte et al., 1992; Tung et al., 1999; Wengelnik et al., 1996).

A clivagem do substrato polimérico origina novas cadeias de sacarídeos com extremidades redutoras. Desta maneira, um maior número de extremidades redutoras denota maior atividade hidrolítica da enzima. A atividade enzimática é determinada como a quantidade de proteína em miligramas necessária para liberar 1 μ mol de açúcares redutores (igual a 0,18 μ g de glicose pelo “método de Lever”) do substrato por minuto (min), nas condições empregadas (Nankai et al., 1992; Fong & Doi, 1992).

Em *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, a ação de enzimas extracelulares como pectato liase (Pel), poligalacturonase (Peh), celulase (Cel) e protease (Prt) são fundamentais para a ocorrência da doença. O nível de tais enzimas é baixo quando o crescimento da bactéria ocorre em meio de cultura SYG (*salts-yeast extract-glycerol*), porém quando esse meio é suplementado com extrato de planta de salsa, atividades enzimáticas são altamente induzidas. A clonagem do alelo *rsmA1* que superexpressa tais proteínas nas espécies RsmA1 e RsmA2, mostrou que o mutante RsmA2 produziu *N*-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona (HSL), um sinal da necessidade para a produção de enzimas extracelulares. Para examinar o papel HSL, foram obtidos mutantes deficientes, através da recombinação dirigida, possibilitando demonstrar que a superprodução de enzimas extracelulares ocorre de maneira independente devido a inativação de um repressor global, o locus *rsmA* (Chatterjee, 1995).

Além da possibilidade de destruição da parede celular da planta, é interessante observar que a interação do fitopatógeno com o hospedeiro se dá justamente através desta estrutura, ou seja, o processo de contato com a parte externa da célula. Cabe salientar que dentre os vários fatores de virulência de fitopatógenos têm-se destacado aqueles injetados no interior da célula vegetal, o que demonstra a adaptação do microrganismo à estrutura da parede celular da planta (Yang et al., 2000; Brown et al., 2001). Dentre estes fatores, está a proteína AvrBs3 que, produzida pela bactéria *X. campestris* pv. *vesicatoria*, é indicada como fator de transcrição no núcleo da célula hospedeira e, como resultado, em plantas suscetíveis causa a hipertrofia das células do mesófilo foliar (Büttner & Bonas, 2002; Marois et al., 2002; Szurek et al., 2002). Além disto, vários fatores relacionados ao reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro e formas de resistência estão envolvidos direta ou indiretamente com a sua localização na parede celular vegetal, o que, por si só, já indica a importância da identificação de agentes capazes de afetar a sua estrutura (Hauck et al., 2003).

No caso da *Xac* sabe-se que a bactéria também injeta fatores de virulência diretamente na célula vegetal, com a intermediação de sistemas de secreção, como no caso da proteína *pthA*, que é inserida no interior da célula da planta de citros através do sistema de secreção do tipo III, e é considerada como fator essencial para o cancro cítrico ocorrer e se manifestar na forma de indução de hipertrofia, hiperplasia e necrose (Yang & Gabriel, 1995a, 1995b; Duan et al., 1999).

Há uma notável homologia entre os sistemas enzimáticos e secretório de *Xanthomonas campestris* e *X. fastidiosa*. Provavelmente esta similaridade é devido à

proximidade evolutiva entre ambas. A mesma organização genética do sistema de secreção de tipo II que é encontrada em *X. campestris* pv. *campestris* é observada em *X. fastidiosa* (Dow & Daniels, 2000). Maior suporte a este compartilhamento advém da alta similaridade entre proteínas que são secretadas via sistema de secreção do tipo II.

Os genes *rpf* (“regulation of pathogenicity factors”) que controlam, entre outras funções, a expressão de exoenzimas em *Xanthomonas* também foram identificados, por homologia de sequência em *X. fastidiosa*, nos genes Xf-1108 a Xf-1115, Xf-287 (*rpfB*) e Xf-290 (*rpfA*). Em *X. campestris* pv. *campestris*, os genes *rpf* são encontrados em cluster, enquanto em *X. fastidiosa* estão localizados parcialmente em cluster (Moreira et al., 2004).

Em muitos casos, a produção de fatores de patogenicidade ou virulência é controlada de maneira dependente da densidade celular. Esta regulação por um “quorum sense” foi descrita inicialmente em *Vibrio fischeri*, um organismo em que a bioluminescência é controlada pelo par LuxI/LuxR (Pierson et al., 1998), e sua regulação através da síntese de homoserina lactona acilada foi demonstrada em *A. tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *P. aeruginosa*, *P. aureofasciens*, *E. coli* e *Ralstonia leguminosarum*, onde está presente o sistema gênico *luxR/luxI*. Em *X. fastidiosa* há somente um componente do sistema regulado por “quorum sense” e em *X. campestris* pv. *campestris*, e possivelmente nas *Xanthomonas* spp., o sistema análogo ao “quorum sense” deve ser um sistema de regulação através de fatores sinais difusíveis (DSF), derivados de ácidos graxos, uma vez que a produção e/ou percepção é controlada pelos genes *rpf*, funcionando como um sistema de sinalização célula a célula (Dow & Daniels, 2000).

Entretanto, não há até o momento informação experimental conhecida a respeito da funcionalidade de sequências de *Xac* potencialmente indicadas como degradadoras de parede celular, sobretudo em condições reais durante a interação entre o patógeno e plantas de citros.

2.7. Parede celular vegetal e celulases

Em todas as paredes celulares vegetais existem duas camadas: a lamela média (substância intercelular) e a parede primária. Inúmeras células depositam uma camada parietal adicional, a parede secundária. A lamela média situa-se entre as paredes

primárias de células adjacentes e a parede secundária, se presente, sendo depositada pelo protoplasto sobre a superfície interna na parede primária. A lamela média compõe-se principalmente de substância pécicas e freqüentemente é difícil distingui-la da parede primária, principalmente nas células que formam paredes secundárias grossas (Raven et al., 1976).

A camada parietal depositada antes e durante o crescimento da célula é chamada de parede primária. Muitas células são formadas única e exclusivamente pela parede primária. Esta camada, além da celulose, contém hemicelulose, pectina e proteínas ricas em hidroxiprolina. Células em divisão ativa comumente contêm apenas paredes primárias, assim como a maioria das células maduras que realizam processos como fotossíntese, respiração e secreção. As paredes primárias, de um modo geral, não são uniformes na espessura em toda a sua extensão. Áreas mais finas, ditas campos primários de pontuação estão presentes. Nestes campos pontuados é comum a presença de filamentos citoplasmáticos, ou plasmodesmatas, intercomunicando os protoplastos vivos de células adjacentes (Raven et al., 1976).

O mais característico dos componentes da parede celular vegetal é a celulose, que constitui grande parte de sua estrutura. As moléculas de celulose estão unidas em microfibrilas. Estas microfibrilas por sua vez, formam delgados filamentos ou fibrilas que podem enrolar-se em torno umas das outras, formando uma macrofibrila com até 500 mil moléculas de celulose. As fibras celulósicas da parede encontram-se em uma matriz reticulada de moléculas não-celulósicas, as hemiceluloses e substâncias pécicas. A lignina é um dos constituintes mais importantes da parede secundária, conferindo-lhe rigidez. Caracteristicamente, a lignificação começa na lamela média, depois espalha-se pela parede primária e finalmente atinge a parede secundária (Raven et al., 1976).

As bactérias fitopatogênicas podem viver nos espaços intercelulares ou no interior das células (como nos elementos de vaso) e dependendo do modo de colonização, podem utilizar enzimas para degradar a parede celular vegetal. Estas enzimas, coletivamente denominadas de enzimas degradadoras da parede celular vegetal, compreendem pectinases, celulasas, xilanases e proteases, podendo apresentar ação tanto sinérgica como seqüencial na degradação dos substratos. A parede celular das plantas superiores é constituída de até 90 % de carboidratos e 10 % de proteínas. Como descrito, as paredes celulares apresentam celulose, hemiceluloses, substâncias pécicas, proteínas e lignina. Entretanto, a proporção e a distribuição destes componentes são

variáveis de acordo com células de diferentes tecidos, idades, condições fenológico-ambientais e mecanismos de defesa da planta hospedeira (Raven et al., 1976).

As celulasas CelV1 e CelS de *E. carotovora* subsp. *carotovora* são coordenadamente induzidas de uma maneira dependente da fase de crescimento e são reprimidas por catabólitos, ou seja, a atividade celulolítica em *E. carotovora* subsp. *carotovora* é necessária para o progresso normal dos sintomas da doença em fumo, sendo assim um determinante de virulência (Mãe et al., 1995). Da mesma forma que a endoglucanase é importante na virulência em *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Mãe et al., 1995), sua importância já foi considerada em *Ralstonia solanacearum* (Roberts et al., 1988). Entretanto, a endoglucanase engXCA de *X. campestris* pv. *campestris* exerce uma pequena função nos primeiros estágios da patogenicidade em nabo e rabanete (Gough et al., 1988; Gough et al., 1990). A parede celular é altamente degradada em cultivares de mandioca suscetíveis à infecção por *X. campestris* pv. *manihotis* (Boher et al., 1997).

Por outro lado, em bactérias fitopatogênicas Gram-positivas como *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* (Jahr et al., 1999; Meletzus et al., 1993) e *C. michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Laine et al., 2000), as endoglucanases apresentam uma função marcante no desenvolvimento dos sintomas, como evidenciado na murcha do tomateiro. Especula-se que as celulasas podem ser responsáveis pela degradação da parede dos vasos do xilema, interferindo no transporte de seiva e permitindo que ocorra a colonização lateral no hospedeiro pela bactéria.

As celulasas hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos ou entre um carboidrato e uma porção não carboidrato. Apresenta como nomes alternativos: avicelase, beta-1,4-endoglucano hidrolase, beta-1,4-glucanase, carboximetil celulase, celudextrinase, endo-1,4-beta-D-glucanase, endo-1,4-beta-glucanase, endoglucanase. A classificação das hidrolases *O*-glicosídicas (EC 3.2.1.–) conforme a nomenclatura enzimática IUB – MB é feita com base na sua especificidade ao substrato e ocasionalmente no seu mecanismo molecular. De acordo com esta nomenclatura, o 3 refere-se a hidrolases; 3.2 glicosilases e 3.2.1. glicosidase, isto é, enzimas que hidrolisam compostos *o*-glicosil ou *s*-glicosil. Uma classificação com base nas similaridades da sequência de aminoácidos do domínio catalítico foi proposta (Henrissat, 1991; Henrissat e Bairoch, 1993) e atualmente as hidrolases glicosídicas são agrupadas em 87 famílias.

A hidrólise enzimática das pontes glicosídicas ocorre através de catálise ácida geral, onde são necessários dois aminoácidos críticos: um doador de próton e um nucleófilo/base. A catálise ácida é usualmente promovida pelos resíduos aspartato ou glutamato, ou ambos. Resíduos encontrados em sítios ativos são usualmente conservados durante a evolução (Gilkes et al., 1991). Nesta catálise, ocorre uma reação de remoção simples ou dupla, resultando em inversão ou retenção, respectivamente, da configuração anomérica do átomo de carbono do glicosídeo hidrolisado (Davies et al., 1997).

Embora quimicamente similares, a celulose e a xilana adotam conformações diferentes. A xilana é mais flexível e apresenta substituições de arabinose, ácido glicorônico ou ácido metilglicorônico. As celulasas são algumas vezes descritas como um grupo complexo de enzimas com ação sinérgica. Este grupo reúne endoglucanases, celulose beta-1,4-celobiosidase, beta-glucosidase, beta-1,3(4)-endo-glucanase.

Outra enzima que age sobre a celulose é a polisulfatase de celulose, que hidrolisa os grupos sulfatos -2 e -3 dos polissulfatos da celulose, não tendo sido encontrada em microrganismos. Bactérias como *Thermothoga neapolitanae* e *Cellulomonas uda* possuem a enzima fosforilase da celobiose, a qual catalisa a formação de D-glicose e D-glicose- α -1-fosfato a partir de celobiose e fosfato (ortofosfato), e é então absorvida e metabolizada. As endoglucanases e as celobiohidrolases degradam celodextrinas solúveis e celulose amorfa, enquanto somente as celobiohidrolases, com notáveis exceções, degradam a celulose cristalina eficientemente (Schülein, 2000).

Algumas hidrolases glicosídicas são enzimas multifuncionais que contêm domínios catalíticos que pertencem a diferentes famílias. As celulasas e xilanasas apresentam múltiplos domínios, podendo possuir domínios catalíticos, domínio ligador de celulose e seqüências ligadoras (Gilkes et al., 1991). Enzimas com seqüências similares (domínios catalíticos) apresentam diferentes especificidades (exo ou endohidrólise), o que sugere que esta atividade seja consequência de detalhes na estrutura tridimensional da proteína. A endoglucanase CelB de *Caldocellum saccharolyticum* tem um domínio exoglucanase N-terminal e outro domínio endoglucanase, este C-terminal, os quais pertencem a diferentes famílias, sendo uma enzima bifuncional (Gilkes et al., 1991).

As exoenzimas produzidas pelas bactérias usualmente contêm um peptídeo sinal, para transporte através da membrana. A endoglucanase engXCA de *X. campestris* pv. *campestris* possui um peptídeo sinal de 25 aminoácidos na extremidade N-terminal

(Gough et al., 1990), ao passo que a endoglucanase S (CelS) de *E. carotovora* subsp. *carotovora* apresenta um peptídio sinal de 32 aminoácido, o qual é clivado da pré-CelS (Saarilhati et al., 1990). Todos os organismos que degradam a celulose cristalina secretam sistemas mais ou menos complexos de celulasas. Tais sistemas são compostos de uma variedade de enzimas com especificidade e modo de ação distintos, as quais agem em sinergia hidrolisando a celulose (Béguin, 1990). Diversos genes que codificam celulasas (endoglucanases) foram clonados e as enzimas caracterizadas a partir de bactérias fitopatogênicas, como em *E. chrysanthemi*, *E. carotovora*, *X. campestris* e *C. michiganensis*.

Dois tipos de mecanismos controlam a síntese e secreção de celulasas. Na maioria dos organismos, a produção de celulase é reprimida na presença de altas concentrações de fonte de carbono prontamente metabolisáveis. Adicionalmente, em diversos sistemas, a síntese de celulase é regulada por celobiose ou soforose, que são geradas a partir da degradação da celulose por pequenas quantidades de celulasas constitutivas (Béguin, 1990).

A síntese de celulasas parece ser regulada em nível transcricional e os transcritos são monocistrônicos. Os genes das celulasas, CelA e CelB, de *Thermotoga neopolitana* são induzíveis por celobiose e reprimidos por glicose. Os principais produtos finais da hidrólise da celulose, glicose e celobiose, competitivamente inibem estas enzimas (Bok et al., 1998). Apesar da capacidade hidrolítica das celulasas, algumas são capazes de efetuar transglicosilação, ou seja, a formação de trímeros e tetrâmeros a partir de celobiose. Kono et al. (1999) relatam a capacidade transglicosídica de uma celulase de *Trichoderma viride*, enquanto Bok et al. (1998) descrevem uma celulase (CelB) de *T. neopolitana* com alta capacidade para efetuar transglicosilação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento.

As linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste estudo estão listados na Tabela 1. A linhagem *Xac* 306 descrita e utilizada durante o seu sequenciamento completo (da Silva et al., 2002), foi rotineiramente cultivada em meio AN (Ágar Nutriente) a 28 °C, enquanto cultivos de *E. coli* foram realizados em meio Luria-Bertani (LB) a 37 °C. O antibiótico kanamicina (50 µg/mL) foi utilizado para seleção de *Xac*, enquanto que para a seleção de *E. coli* utilizou-se o antibiótico ampicilina (100mg/mL). Os plasmídeos foram extraídos e preparados a partir de linhagens de *E. coli* através do método de lise alcalina.

Tabela 1. Linhagens bacterianas e plasmídeos.

Linhagem ou plasmídeo	Características	Fonte ou referência
<i>E. coli</i> DH5α	$F^- \phi 80 \text{dlacZ} \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 \text{endA1}$ $deoR \text{recA1} \text{hsdR17}(\text{r}_K^- \text{m}_K^+) \text{phoA} \text{supE44} \lambda^- \text{thi-1}$ $\text{gyrA96} \text{relA1}$	Gibco
<i>Xac</i>		
306	Tipo Selvagem, Ap ^r	R. P. Leite
306 Δ XAC0028	Mutante de 306, mutante XAC0028, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC0029	Mutante de 306, mutante XAC0029, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC0030	Mutante de 306, mutante XAC0030, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC0143	Mutante de 306, mutante XAC0143, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC0168	Mutante de 306, mutante XAC0168, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC0346	Mutante de 306, mutante XAC0346, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC0612	Mutante de 306, mutante XAC0612, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC0661	Mutante de 306, mutante XAC0661, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC1770	Mutante de 306, mutante XAC1770, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC1793	Mutante de 306, mutante XAC1793, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC2373	Mutante de 306, mutante XAC2374, Km ^r	Este estudo
306 Δ XAC2374	Mutante de 306, mutante XAC2374, Km ^r	Este estudo

306ΔXAC2522	Mutante de 306, mutante XAC2522, Km ^r	Este estudo
306ΔXAC2986	Mutante de 306, mutante XAC2986, Km ^r	Este estudo
306ΔXAC3076	Mutante de 306, mutante XAC3076, Km ^r	Este estudo
306ΔXAC3516	Mutante de 306, mutante XAC3516, Km ^r	Este estudo
306ΔXAC3562	Mutante de 306, mutante XAC3562, Km ^r	Este estudo
306ΔXAC4231	Mutante de 306, mutante XAC4231, Km ^r	Este estudo
306ΔXACxpsD	Mutante de 306 por inserção de <i>transposon</i> , mutante XACxpsD, Km ^r	Este estudo

Plasmídeo

Pk18mobGUSII	PUC18 derivative, <i>lacZα</i> , <i>mob</i> , <i>gusA</i> , Km ^r	Katzen et al. (1998)
Pk18mobGUSII0028	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 424 a 970	Este estudo
Pk18mobGUSII0029	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 348 a 917	Este estudo
Pk18mobGUSII0030	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 322 a 936	Este estudo
Pk18mobGUSII0143	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 260 a 751	Este estudo
Pk18mobGUSII0168	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 81 a 728	Este estudo
Pk18mobGUSII0346	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 374 a 983	Este estudo
Pk18mobGUSII0612	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 7 a 1379	Este estudo
Pk18mobGUSII0661	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 118 a 1032	Este estudo
Pk18mobGUSII1770	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 311 a 758	Este estudo
Pk18mobGUSII1793	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 254 a 876	Este estudo
Pk18mobGUSII2373	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 314	Este estudo

	a 1266	
Pk18mobGUSII2374	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 7 a 1656	Este estudo
Pk18mobGUSII2522	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 4 a 1736	Este estudo
Pk18mobGUSII2986	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 256 a 872	Este estudo
Pk18mobGUSII3076	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 696 a 1237	Este estudo
Pk18mobGUSII3516	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 115 a 1139	Este estudo
Pk18mobGUSII3562	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 255 a 869	Este estudo
Pk18mobGUSII4231	Km ^r , pk18mobGUSII contendo os nucleotídeos 409 a 1181	Este estudo

3.2. Manutenção e crescimento da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Todo o estudo foi conduzido com o isolado *Xac* 306, cujo genoma foi seqüenciado (da Silva et al., 2002). Para a preparação de células competentes, suspensão foi coletada com alça de platina a partir de cultura permanente (inoculada em glicerol e preservada a -70 °C) e plaqueada em meio AN, sem adição de antibióticos. As placas foram incubadas durante 48 horas a 28 °C. Colônias foram raspadas das placas e transferidas para frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio AN para crescimento sob agitação (140 rpm) a 28 °C durante cerca de 4 horas. Após crescimento no meio líquido até O.D.₆₀₀ = 0,6 [$\sim 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL], que corresponde à fase *midlog* de crescimento, as células foram mantidas em gelo por cerca de 1 h, para posteriormente serem coletadas e lavadas por centrifugação (4000 xg), por 10 min, a 4 °C com suspensões em 1 e 0,5 volumes de glicerol a 10 % estéril e resfriado. A última lavagem foi realizada pela adição de 1 mL de glicerol a 10 % estéril e resfriado e centrifugação a 13000 xg, durante 2 min e a 4 °C. O sobrenadante foi parcialmente removido para permitir apenas a suspensão do sedimento e uma

concentração final de cerca de 4×10^{10} UFC/mL. Finalmente, as células competentes foram mantidas no gelo até a transformação (1-2 horas).

3.3. Mutagênese por inserção aleatória

Uma coleção de mutantes foi obtida através do complexo “EZ::TN <KAN-2> transposome” (Figura 1A, Anexo), que é uma mistura do *transposon* EZ::TN <KAN-2> e da enzima “EZ::TN transposase” (Epicentre Technologies, Madison, Wis.), introduzido por eletroporação diretamente em células competentes de *Xac*. Estas células foram preparadas como descrito por Amaral et al. (2005) e eletrotransformadas em volume de 50 µL de células competentes, com o uso do aparelho “Gene Pulser II Electroporator” (Bio-Rad, Hercules, Calif.), com os seguintes parâmetros: 50 Ω, 50 µF e 2,5 kV em uma cuvette de “gap” de 0,2 cm. Imediatamente após o pulso elétrico, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio líquido SOC (Apêndice) e submetidas a crescimento por 2-3 h a 28 °C em agitação constante de 180 rpm.

Placas de cultura permanente contendo a coleção de mutantes foram acondicionadas em *ultra-freezer* de ultra-resfriamento e utilizadas para o plaqueamento em escala (conjuntos de 500 clones por teste) para os ensaios de seleção de transformantes com alteração na capacidade de degradação de do reagente carboximetilcelulose em placa de Petri.

3.4. Mutagênese dirigida

Para a construção dos mutantes sítio-dirigidos foram desenvolvidos *primers* que amplificam segmentos de ORFs (Tabela 2) que apresentaram homologia com genes que codificam para proteínas associadas à degradação de parede celular. Cabe salientar que mesmo aquelas ORFs anotadas como indiretamente ligadas à degradação, como isomerases, foram incluídas pois, como não apresentavam resultado experimental, poderiam ter sido parcialmente caracterizadas. Os *primers* desenvolvidos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 2. ORFs identificadas no genoma de *Xac* 306, anotadas como diretamente envolvidas na degradação de parede celular e homologia com organismos representativos.

ORF	Nome da proteína	Organismo	E-value
XAC0028	Endo-1,4-beta-glucanase	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	e-106
XAC0029	Endo-1,4-beta-glucanase	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	e-102
XAC0030	Endo-1,4-beta-glucanase	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	e-112
XAC0143	2-queto-3-deoxigluconate quinase	<i>Thermotoga maritima</i>	2e-52
XAC0168	4-deoxi-L-threo-5-hexosulose-uronato quetol-isomerase	<i>Caulobacter crescentus</i>	e-116
XAC0346	Celulase (degenerada) FII-CMCCase	<i>Aspergillus aculeatus</i>	2e-10
XAC0612	Endo-1,4-beta-glucanase (endoglucanase extracelular)	<i>X. campestris</i> pv. Campestris	0,0
XAC0661	Precursor de poligalacturonase	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	3e-53
XAC1770	Proteína hipotética	<i>Mesorhizobium loti</i>	3e-24
XAC1793	1,4-beta-D-glucano glucohidrolase	<i>C. crescentus</i>	0,0
XAC2373	Pectato liase (degenerada)	<i>Bacillus halodurans</i>	2e-13
XAC2374	Poligalacturonase	<i>Ralstonia solanacearum</i>	e-163
XAC2522	Precursor endo-1,4-beta-D-glucanase	<i>X. campestris</i> pv. campestris	0,0
XAC2986	Pectato liase	<i>P. carotovorum</i>	3e-66
XAC3076	Glucano 1,4-beta-glucosidase	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	0,0
XAC3516	Celulase	<i>P. carotovorum</i> subsp. carotovorum	3e-81
XAC3562	Pectato liase	<i>X. campestris</i> pv. malvacearum	0,0
XAC4231	Glucano 1,4-beta-glucosidase	<i>X. fastidiosa</i> 9a5c	0,0

Inicialmente, os parâmetros de amplificação de cada ORF foram (em cada reação de 50 µL): 10-100 ng de DNA genômico, 10 X tampão de amplificação, 2µM de cada *primer*, 5,0 µL de 50mM MgCl₂, 0,2 mM de mix de dNTP e 1 unidade de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM). As amplificações foram realizadas em 29 ciclos de 94 °C por 2 min, 94 °C por 30 seg, 62 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min 30 seg, com extensão final de 56 °C por 40 seg e 72 °C por 5 min.

Após avaliação em gel de agarose para confirmação de tamanho de produto da amplificação (fragmento “truncado”, ou seja, com sequência incompleta da ORF) (Figura 2A e 3A, Anexo), 14 dos fragmentos gerados a partir de região interna dos genes de interesse foram sub-clonados no sítio *EcoRI* do plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO (Figura 4A, Anexo), com comprimento de 3,9 kb, genes para resistência a kanamicina e ampicilina e gene repórter (*LacZ*).

Tabela 3. *Primers* desenvolvidos para ORFs identificadas no genoma de *Xac* 306, anotadas como diretamente envolvidas na degradação de celulose.

Primer	Sequência do nucleotídeo (5'→3')^a	Uso
0028F	GCTCTAGATTACCGATCTATGGCGTCGTT	Construção do mutante 306ΔXAC0028
0028R	GCTCTAGAAAGCGTAGCTGAGGTTCCA	Construção do mutante 306ΔXAC0028
0029F	GCTCTAGAGTACGTGATCGTGGATGTGC	Construção do mutante 306ΔXAC0029
0029R	GCTCTAGACACACATCGCTGTTGGATTC	Construção do mutante 306ΔXAC0029
0030F	GCTCTAGATTGGGGCTGATCAAGAAGTC	Construção do mutante 306ΔXAC0030
0030R	GCTCTAGAACGTCGCTGTTCTTTTCCAT	Construção do mutante 306ΔXAC0030
0143F	GCTCTAGACATGGGCCTGTATTCCTGA	Construção do mutante 306ΔXAC0143
0143R	GCTCTAGACTGTGGTGGTCCACGTGAT	Construção do mutante 306ΔXAC0143
0168F	GCTCTAGAGTATCTGCTCGATGGGCTG T	Construção do mutante 306ΔXAC0168
0168R	GCTCTAGAACCGCTTCGTTGTTCTGAAT	Construção do mutante 306ΔXAC0168
0346F	GCTCTAGAAGGACGCGTTGGACAATATC	Construção do mutante 306ΔXAC0346
0346R	GCTCTAGATAGTTGTGCGCCTCGTACAC	Construção do mutante 306ΔXAC0346
0612F	ATTTTCAGGGCTGCAAGTACG	Construção do mutante 306ΔXAC0612

0612R	AGCGTGCGGTTGTAGTCC	Construção do mutante 306ΔXAC0612
0661F	GCTCTAGAACTTGTGAGCCGTCCTTGAA	Construção do mutante 306ΔXAC0661
0661R	GCTCTAGAAATCAGACTGACCGGACCAC	Construção do mutante 306ΔXAC0661
1770F	GCTCTAGAGGAATCTGATGGGAATCGAC	Construção do mutante 306ΔXAC1770
1770R	GCTCTAGAGTCGAAACGCCACATAGAT	Construção do mutante 306ΔXAC1770
1793F	GCTCTAGAGAGCGTGGAAGAGAAGGTTG	Construção do mutante 306ΔXAC1793
1793R	GCTCTAGACATGGTAGCTTCGGACACCT	Construção do mutante 306ΔXAC1793
2373F	GCTCTAGAGCACTCAATGCCAAAAGTCA	Construção do mutante 306ΔXAC2373
2373R	GCTCTAGAACTCTTGCCGAATCATCAGG	Construção do mutante 306ΔXAC2373
2374F	TACCATCGCCTTGTTCCC	Construção do mutante 306ΔXAC2374
2374R	CGGCAGTACCGAGTGATAGG	Construção do mutante 306ΔXAC2374
2522F	ACTATCTTCAAGACTCTGCTCACC	Construção do mutante 306ΔXAC2522
2522R	GCGCTCACATACACCAGC	Construção do mutante 306ΔXAC2522
2986F	GCTCTAGAGCCAAGACAGTGCAGATCAA	Construção do mutante 306ΔXAC2986
2986R	GCTCTAGATTGATCAGGTCCCAGTAGCC	Construção do mutante 306ΔXAC2986
3076F	GCTCTAGAGGTGATGTGTGCCTACAACG	Construção do mutante 306ΔXAC3076
3076R	GCTCTAGAACGAAGTGCCCTGGTAATTG	Construção do mutante 306ΔXAC3076
3516F	TTCGTCGACAAGCACATCC	Construção do mutante 306ΔXAC3516
3516R	ATGCAGGGGTTCTCCAGG	Construção do mutante 306ΔXAC3516
3562F	GCTCTAGACGATATCAGCGAAGGAAAGC	Construção do mutante 306ΔXAC3562
3562R	GCTCTAGAGAGAACGGATACACCGCATT	Construção do mutante 306ΔXAC3562
4231F	GCTCTAGATATCAGGGGCTGACCTTCTG	Construção do mutante 306ΔXAC4231
4231R	GCTCTAGATCGTTCTTCAACAGCACCAG	Construção do mutante 306ΔXAC4231
KAN RP-1	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	Seqüenciamento
KAN2 FP-1	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	Seqüenciamento

KanA	CATGCAAGCTTCAGGGTTGA	Seqüenciamento
AD1	NTCGA(G/C)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT	Seqüenciamento
AD2	NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA	Seqüenciamento
AD3	(A/T)GTGNAG(A/T)ANCANAGA	Seqüenciamento
AD4	AG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(A/T)AGG	Seqüenciamento
AphF	GAAGGGACTGGCTGCTATTG	Amplificação de Kan ^R
AphR	AATATCACGGGTAGCCAACG	Amplificação de Kan ^R
NptIIF	GCCCGATGCGCCAGAGTTG	Amplificação de Kan ^R
NptIIR	CAGACTTGTTCAACAGGCCAG	Amplificação de Kan ^R

a- Sítio de restrição *Xba*I está sublinhado

Para a reação de ligação, cerca de 1 a 3 μ L da solução com o fragmento amplificado e purificado foram adicionados à solução contendo 1 μ L de 10X tampão de ligação, 1 μ L da enzima T4 DNA (4 U/ μ L) ligase, 2 μ L do vetor pCR[®]2.1-TOPO (25ng/ μ L) completados para 10 μ L. O volume final foi submetido à temperatura de 14 °C, por 24 h. Em seguida, a reação foi colocada em gelo e uma alíquota de 1 μ L foi misturada a cerca de 50 μ L da solução de células competentes de *E. coli* DH5 α para transformação por choque térmico, plaqueamento e seleção (TA Cloning[®] Kit, Invitrogen[™]).

As colônias selecionadas após a sub-clonagem foram coletadas e transferidas para tubos contendo 5 mL de meio LB para crescimento sob agitação (225 rpm) a 37 °C, por 16 horas. Após o crescimento, 1,5 mL das culturas foram centrifugados (12000 xg), por 10 seg à temperatura ambiente; o sobrenadante foi parcialmente removido. Em seguida, adicionaram-se 300 μ L de TE contendo 0,1 N de NaOH e 0,5% SDS e 150 μ L de 3,0 M NaOAc (pH = 5,2) centrifugando (12000 xg), por 2 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo para a precipitação do DNA plasmidial, com etanol 100% seguido de lavagens com etanol 70%, liofilização para remover o etanol remanescente e ressuspensão do sedimento em água pura Milli-Q para, em seguida, verificar a presença da construção nas células transformadas e quantificá-la.

A minipreparação de DNA dos plasmídeos contendo as ORFs sub-clonadas (Figura 5A, Anexo) foi utilizada para confirmação da transformação através de PCR e

pela clivagem com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Figura 6A, Anexo). Após confirmação por tamanho de banda, o fragmento da ORF em questão (sequência interrompida) foi purificado com “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” – (Amersham Biosciences) e quantificado em gel de agarose a 1%.

Em seguida, foi realizada a clonagem no “sítio de múltipla clonagem” do vetor suicida pK18*mob*GUSII (Figura 7A, Anexo) que apresenta comprimento de 5,9 kb e o gene repórter *gus*, que permite a degradação do composto X-Gluc em placa, representado mais um gene repórter útil e já testado em *X. campestris* pv. *campestris* (Katzen et al., 1998). Este plasmídeo não apresenta replicação em *Xac*, ou seja, pode ser utilizado satisfatoriamente como “vetor suicida”.

Células de *E. coli* portando o plasmídeo pk18*mob*GUSII foram coletadas a partir de cultura permanente (inoculada em glicerol e preservada a -70 °C) e plaqueada em meio LB, com adição de antibiótico ampicilina (100 mg/mL). A placa foi incubada durante a noite a 37 °C. Colônias foram transferidas para frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio LB para crescimento sob agitação (140 rpm) a 37 °C durante cerca de 4 h. Após crescimento no meio líquido até OD₆₀₀ = 0,6, foi realizada a extração do DNA plasmidial, seguida de purificação com “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” – (Amersham Biosciences).

Os segmentos amplificados das ORFs, a minipreparação de DNA dos plasmídeos contendo as ORFs sub-clonadas e o plasmídeo pk18*mob*GUSII purificados e quantificados foram clivados por endonucleases de restrição comum a ambos (Figura 8A, Anexo), (*EcoRI*, *PstI*, *SalI*, *SmaI* ou *XbaI*). Após a reação, o plasmídeo pk18*mob*GUSII foi defosforilado usando (para cada 25 µL de reação) 1,5 µg do vetor linearizado com as diferentes enzimas de restrição, 10X tampão da enzima fofatase alcalina, 1 unidade de fosfatase alcalina, durante 30 min a 37 °C, adicionando-se, após esse tempo, mais uma unidade da fosfatase alcalina, durante 15 min a 37 °C, para então inativá-la a 75 °C por 10 min e purificar o fragmento defosforilado em gel *low melting* (0,8%) (Sambrook et al., 1989). A reação de defosforilação foi realizada a fim de aumentar a eficiência da ligação dos fragmentos de DNA, previamente clivados, purificados e quantificados, no plasmídeo pk18*mob*GUSII (também clivado, quantificado e defosforilado). Em seguida, uma nova reação de ligação foi feita com cerca de 3 µL da solução de cada um dos 4 fragmentos apenas amplificados (digeridos com *EcoRI*, *PstI*, *SalI* ou *SmaI*) e 3 µL da solução de cada um dos 14 fragmentos amplificados sub-clonados (digerido com a enzima *EcoRI*), adicionados a solução

contendo 1 µL de 10X tampão de ligação, 1 µL da enzima T4 DNA ligase (4 U/µL), 1 µL da solução do plasmídeo pk18*mob*GUSII (clivado, quantificado, defosforilado e purificado), completados para 10 µL. O volume final foi submetido à temperatura de 16 °C, por 24 horas. A reação foi colocada no gelo e uma alíquota de 1 µL foi misturada a cerca de 50 µL de solução com células competentes de *E. coli*, para transformação por eletroporação, plaqueamento e seleção.

As colônias selecionadas após a transformação foram coletadas e transferidas para tubos contendo 5 mL de meio LB para crescimento sob agitação (225 rpm) a 37 °C, overnight. Após o crescimento, 1,5 mL das culturas foram centrifugados (12000 xg), por 10 seg à temperatura ambiente; o sobrenadante foi parcialmente removido para permitir apenas a ressuspensão do sedimento. Em seguida, adicionaram-se 300µL de TE contendo 0,1 N de NaOH e 0,5% SDS e 150µL de 3,0 M NaOAc (pH = 5,2) centrifugando (12000 xg), por 2 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo para a precipitação do DNA plasmidial, com etanol 100% seguido de lavagens com etanol 70%, liofilização para remover o etanol remanescente e suspensão do sedimento em água pura Milli-Q para em seguida verificar a presença do inserto nas células transformadas e quantificá-lo (Figura 9A, Anexo).

Após confirmação por tamanho de banda, através de PCR com *primers* que amplificam fragmento da ORF em questão (seqüência interrompida), o clone recombinante foi purificado e utilizado na mutagênese de *Xac*.

O plasmídeo pK18*mob*GUSII foi transferido por eletroporação para *Xac*, com os mesmos procedimentos utilizados para a realização da mutagênese aleatória. As linhagens de *Xac* com integração do plasmídeo híbrido no genoma por evento de recombinação homóloga simples foram selecionadas pela resistência a antibiótico kanamicina (50µg/mL), e a confirmação de inserção de plasmídeo inteiro (causando a ruptura do gene por mutação com inserção e duplicação) foi realizada com uso de PCR, *Southern blot* e expressão do gene *gus*, que codifica a enzima β-glucuronidase, cuja atividade leva à formação de um precipitado azul na presença do substrato X-gluc. Este gene não ocorre em eucariotes e, por isso, é utilizado como repórter para revelar eventos de transformação. De acordo com testes realizados em *X. campestris* pv. *campestris*, colônias cultivadas em meio de cultura com ou sem antibiótico contendo 50µg de X-gluc/mL foram suficientes para a expressão do gene *gus* (Katzen et al., 1998). Para a expressão desse gene nos mutantes sítio-dirigidos obtidos, as colônias foram cultivadas em placas de Petri com meio de cultura NBY (5,0g de Peptona; 3,0g de Extrato de

carne; 2,0g de Extrato de levedura; 2,0g de K₂HPO₄; 0,5g de KH₂PO₄; 15,0g de Ágar; pH = 7,2) contendo o antibiótico kanamicina (50µg/) a 28 °C por 48 horas, para então serem mantidas a 4 °C por uma semana.

3.5. Isolamento do DNA genômico, *Southern blot* e seqüenciamento

Todos os procedimentos para manipulação do DNA recombinante seguiram os protocolos já estabelecidos (Sambrook et al., 1989). Os transformantes para resistência a kanamicina que expressaram resposta modificada para degradação de carboximetilcelulose (CMC) foram selecionados e tiveram o DNA genômico total purificado através do kit “MasterPure™ DNA purification” (Epicentre Technologies).

Para o método de *Southern blot* e hibridação, 2 µg de DNA genômico de cada linhagem de *Xac* foram digeridos com *Eco*RI (mutantes obtidos por recombinação homóloga) e com *Eco*RI, *Eco*RV e *Nco*I (mutante obtido por inserção aleatória), separados por eletroforese em gel de agarose a 0,8 % e transferidos para membrana de nylon Hybond™-N (Amersham Biosciences) em 5M de NaOH, com subsequente “cross-linking” por exposição a irradiação de UV. As hibridações foram realizadas a 65 °C, durante a noite no equipamento “Hybridizer HB – 1000” (UVP® Laboratory Products) (Sambrook et al., 1989). A análise de *Southern blot* foi realizada com sonda produzida a partir de produtos de PCR marcados com digoxigenina (DIG) e correspondendo a fragmento de 422 pares de bases do gene para resistência a kanamicina *aph* (amino-fosfotransferase), presente no plasmídeo pK18*mob*GUSII e 399 pares de base do gene para resistência a kanamicina *npt*II (neomicina fosfotransferase II), presente no “complexo transposoma”, com o uso do kits “PCR DIG Probe Synthesis Kit” e “DIG DNA Labeling and Detection Kit” (Roche Diagnosis, Indianapolis, Ind.). A análise foi utilizada para confirmar a inserção única do *transposon* EZ::TN <KAN-2> e a recombinação homóloga.

Para a identificação dos pontos de inserção de *transposon* nos mutantes aleatórios foi utilizada a técnica denominada “TAIL-PCR” (*Thermo Assimetric Interlaced-PCR*), que permite seqüenciar as regiões que flanqueiam o sítio de inserção através de três reações sucessivas de amplificação, combinando primers que complementam uma seqüência conhecida do inserto (T-DNA, *transposon*, entre outros) e primers arbitrários degenerados que se ligam às seqüências adjacentes (Liu e Whittier, 1995; Liu et al., 1995). As reações de seqüenciamento foram concentradas por precipitação com

isopropanol e lavadas com etanol a 70%. Em seguida, 10µL do reagente formamida foram adicionados às amostras e denaturados a 95 °C por 5 min, para serem injetadas no sequenciador “ABI Prism 3700 DNA” (PE Biosystems). Os sítios de transposição genômica foram localizados com procura por homologia através do programa BLAST (Altschul et al., 1997) do “National Center for Biotechnology Information”.

3.6. Ensaio em placa para atividade enzimática

Para a seleção e avaliação de mutantes com alteração da capacidade de degradação de celulose, foi utilizado o composto carboximetilcelulose (CMC), que foi incorporado a 0,5 % (peso/volume) em placas contendo NaNO₃ (0,1%), K₂HPO₄ (0,1%), KCl (0,1%), MgSO₄ (0,05%), Extrato de levedura (0,05%), Glicose (0,1%), Ágar (1,7%). Cada clone foi inoculado no meio de cultura sólido com suspensão (7 µL, O.D.₆₀₀ = 0,6) para formação de colônia individualizada. Adicionalmente, orifícios produzidos com o auxílio de vazador foram formados em placas com o mesmo meio anteriormente descrito, para verificação “em profundidade” de possível secreção de enzimas degradadoras de celulose. As placas foram incubadas por 24 horas a 28 °C. Em seguida, as colônias foram removidas com água e a superfície da placa coberta por solução com corante Vermelho do Congo, a 0,1% (peso/volume) em água, por 15 min e neutralizado com lavagens por 15 min com 1M NaCl.

Os fenótipos para atividade de CMCase foram registrados a partir de modificações identificadas na extensão do halo de degradação, seguidas de medição de regiões sem coloração vermelha corresponderam a áreas em que o CMC foi degradado (Chatterjee et al., 1995; Spiridonov e Wilson, 2000), o que é amplamente utilizado para identificação e comparação de atividade enzimática de proteínas envolvidas neste processo (Chatterjee et al., 2002; Murashima et al., 2003). Todos os clones de mutantes aleatórios e sítio-dirigidos foram submetidos ao teste de degradação de CMC em placa. Os clones que apresentaram alteração foram submetidos ao teste de patogenicidade em planta.

Além disso, suspensões bacterianas do mutante aleatório que manifestou alteração pronunciada de perfil de degradação de CMC e da linhagem selvagem foram cultivadas em 10 mL de meio líquido XVM2, o qual induz a expressão de genes *hrp* (“hypersensitive reaction and pathogenicity”) (Bonas et al., 2000; Astua-Monge et al., 2005) por 48 horas a 28 °C. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas por 7 min a

12000 rpm, filtradas em membrana Millipore® de 0,22 µm e colocadas em contato com o substrato CMC em placas de Petri (7µL de cada suspensão filtrada). Para a comparação experimental da atividade enzimática do mutante e da linhagem selvagem.

3.7. Testes de patogenicidade

Ensaio de patogenicidade foram realizados com o uso de mudas de laranjeira Baía (*Citrus sinensis* L. Osb.), que é altamente suscetível ao cancro cítrico. Todas as plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, em ambiente de contenção localizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico, em Campinas-SP, sob controle diurno de temperatura com limite máximo de 28 °C. Para os ensaios *in vitro* as inoculações foram realizadas em folhas destacadas mantidas em tubos Falcon de 50 mL, contendo 5mL de água, em BOD a 28 °C (Belasque Júnior et al., 2003; Francischini et al., 2003). A concentração do inóculo de bactéria utilizada para infiltração foi realizada através de ajuste da suspensão com 0,5% NaCl para alcançar a O.D.₆₀₀ = 0,6. Para os testes de patogenicidade, folhas com tamanho que corresponde a cerca de 50-80% do tamanho final foram infiltradas com seringa de 1mL de volume total, com agulha, na superfície abaxial do limbo, até atingir o encharcamento do tecido (Figura 4). No outro lado da mesma folha foi realizada a inoculação da *Xac* 306 (controle). Os sintomas foram registrados através de avaliação visual da lesão.



Figura 4. Teste de inoculação por infiltração em tecido foliar. **A.** Infiltração em folhas da laranjeira Baía. **B.** Detalhe do “encharcamento” do tecido foliar provocado imediatamente após a inoculação.

Os ensaios efetuados para a determinação da curva de crescimento da bactéria dentro da planta foram obtidos através de amostras de folhas de plantas inoculadas por

intervalos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Para cada clone, três amostras de discos de 1 cm² de tecido infiltrado foram coletados, transferidos para cadinho juntamente com 1 mL de tampão fosfato (PB) 0,01 M pH 7,2 (7,1 mL de KH₂PO₄ + 2,83 mL de KHPO₄ de soluções 1 M) e triturados. Após 10 min de repouso, 10µL da suspensão bacteriana resultante foram transferidos para microtubo contendo 990µL de água destilada e esterilizada, para diluições das amostras homogeneizadas, com plaqueamento em meio com ágar nutriente e kanamicina (50µg/mL). As colônias selvagens foram cultivadas em meio sem o antibiótico. As placas foram incubadas por 2-3 dias a 28 °C para acompanhamento do crescimento bacteriano. As contagens de colônias foram consideradas para 1 cm² de tecido e os resultados colocados em gráfico.

4. RESULTADOS

4.1. Construção da coleção de linhagens obtidas por mutação

Para verificar a funcionalidade de genes de *Xac* para degradação de celulose, foram realizadas mutações sítio-dirigidas (nockout gênico) das seqüências (ORFs) que apresentaram, durante o processo de anotação do genoma completo da bactéria, homologia com genes que codificam para proteínas associadas à degradação de parede celular. Linhagens de *Xac* para todas as ORFs submetidas a mutagênese direcional foram obtidas, totalizando 18 mutantes (Tabela 4). O knockout destas seqüências foi realizado através de recombinação homóloga simples, como esquematicamente representada na Figura 5, com o uso do plasmídeo “suicida” pK18*mob*GUSII com o gene de interesse amplificado e com “truncamento”. A obtenção de transformantes neste estudo demonstrou a capacidade deste plasmídeo ser utilizado para tal evento em *Xac*.

Em adição, para a seleção de outros genes previamente não identificados com a mesma função durante o processo de anotação, ou seja, degradação de parede celular, uma coleção de mutantes foi produzida através da inserção aleatória de *transposon* e posteriormente selecionada quanto à capacidade de cada linhagem em degradar CMC. De acordo com as condições do experimento, foram produzidas inicialmente 3000 linhagens de mutantes gerados por inserção aleatória e, em seguida, a mesma coleção foi aumentada para 9423 clones. Depois de dez sucessivas subculturas em meio AN contendo ou não o antibiótico kanamicina (50µg/mL), todos os transformantes mantiveram a resistência a kanamicina, sugerindo que a inserção aleatória do *transposon* foi estável, assim como a inserção do plasmídeo pK18*mob*GUSII.

Tabela 4. Seqüências de leitura aberta (ORFs) identificadas no genoma de *Xac* e anotadas como diretamente envolvidas na degradação de parede celular, tamanho original e tamanho obtido após a amplificação.

<i>ORF</i>	LBI*	Tamanho da ORF completa (pb)	Tamanho do produto de amplificação (pb)
XAC0028	5383.1	1134	546
XAC0029	5379.1	1053	570
XAC0030	5376.1	1074	614
XAC0143	3670.1	1023	491
XAC0168	7685.1	855	647
XAC0346	25612.1	1362	609

XAC0612	7781.1	1425	1372 (540)**
XAC0661	5028.1	1392	914
XAC1770	3445.1	2256	447
XAC1793	117.1	2613	622
XAC2373	25654.1	1305	952
XAC2374	6377.1	1671	1649 (594)
XAC2522	98.1	1761	1732 (953)
XAC2986	6191.1	1062	616
XAC3076	4626.1	2661	541
XAC3516	25218.1	1155	1024 (417)
XAC3562	3080.1	1134	614
XAC4231	1398.1	2706	772

(*) Denominação de ORFs de acordo com a página de acesso do Laboratório de Bioinformática (LBI) da Universidade de Campinas (Unicamp) (www.lbi.ic.unicamp.br).

(**) Entre parêntesis o tamanho final do produto de PCR submetido à digestão com endonucleases.

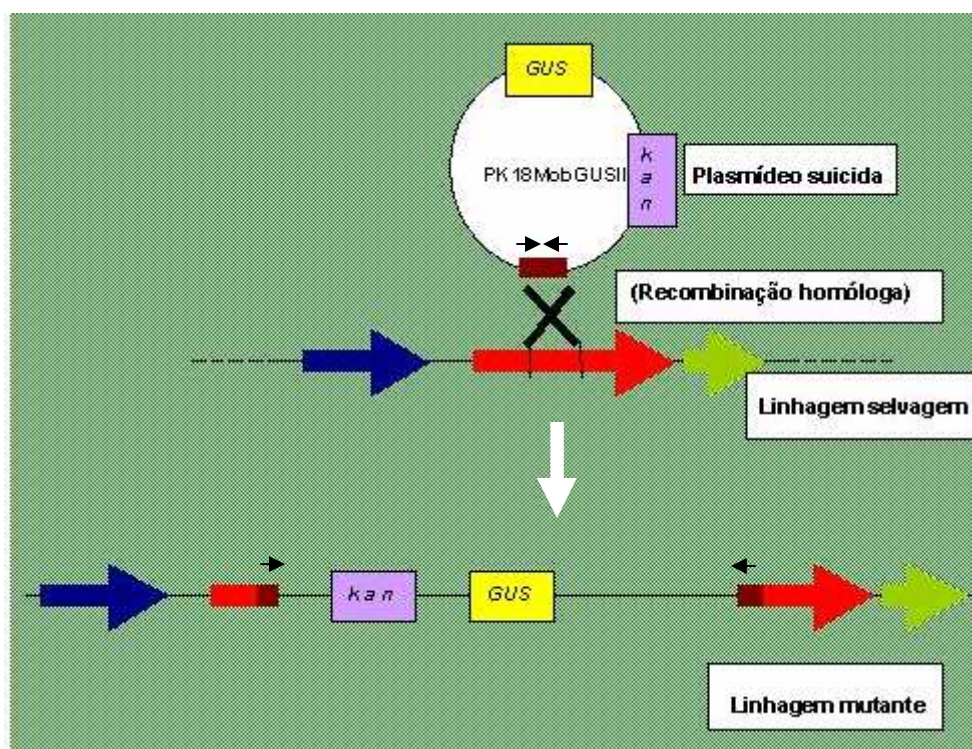


Figura 5. Representação geral do nocaute gênico por recombinação homóloga simples com uso de plasmídeo “suicida” (setas negras indicam o local de pareamento dos *primers* para amplificação da ORF “truncada”).

4.2. PCR, expressão do gene *gus* e *Southern Blot* para confirmação da transformação

Todos os transformantes obtidos através de inserção de *transposon* e que apresentaram alteração na capacidade de degradar celulose assim como todos produzidos por mutagênese dirigida apresentaram a inserção de cassete com marca de seleção (genes *aph* ou *nptII*), como verificado através de PCR e *Southern blot*.

Para os mutantes dirigidos, a inserção do plasmídeo pk18*mob*GUSII no genoma de todas as linhagens foi comprovada através de PCR e teste com gene repórter.

Foram utilizados os *primers* que amplificam fragmento do gene *aph* (422 pb) presente no plasmídeo (Figura 6) e os *primers* utilizados para a mutagênese. Com estes últimos, o objetivo foi comprovar que houve inserção no sítio correto para a ORF desejada, como ilustrado pelo local de pareamento dos *primers* no esquema da Figura 5. Adicionalmente, foi verificada a atividade do gene repórter *gus* em placa de Petri (Figura 7).

Para o mutante aleatório, a presença do *transposon* EZ::TN<Kan-2> foi comprovada com o uso de *primers* que amplificaram fragmento do gene *nptII* (399 pb).



Figura 6. Eletroforese em agarose (0,8%) com os produtos de amplificação (PCR) para confirmação de inserção de cassete com gene para resistência a kanamicina. **A.** Produtos de amplificação do gene *aph* (presente no cassete do plasmídeo pk18*mob*GUSII). M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: PCR com ausência de DNA; 2: Controle negativo (linhagem selvagem de *Xac* 306); 3: Controle positivo (pk18*mob*GUSII); 4: XAC0028; 5: XAC0029; 6: XAC0030; 7: XAC0143; 8: XAC0168; 9: XAC0346; 10: XAC0612; 11: XAC0661; 12: XAC1770; 13: XAC1793; 14: XAC2373; 15: XAC2374; 16: XAC2522; 17: XAC2986; 18: XAC3076; 19: XAC3516; 20: XAC3562; 21: XAC4231. **B.** Produtos de amplificação do gene *nptII*. M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: PCR com ausência de DNA; 2: Controle negativo (linhagem selvagem de *Xac* 306); 3 e 4:

Amplificação de DNA diretamente de colônia (diluições 1:10 e 1:100, respectivamente) do mutante aleatório 30E9.

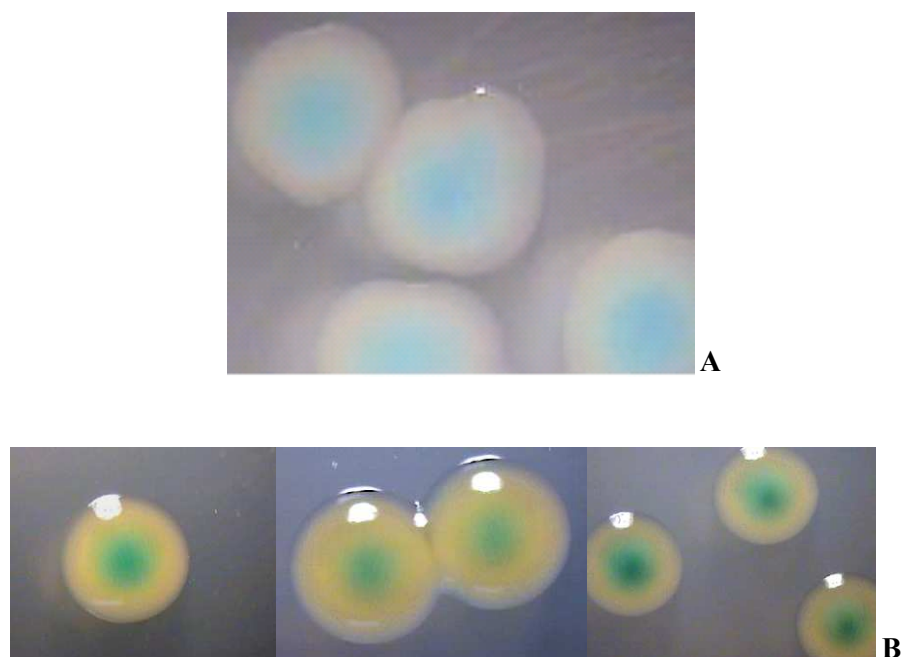


Figura 7. Expressão do gene *gus* em colônias cultivadas em meio de cultura contendo X-gluc. **A.** Colônias de *E. coli* com o plasmídeo pK18*mob*GUSII em meio LB, após 24 horas de crescimento a 37 °C; **B.** Colônias de alguns mutantes dirigidos de *Xac* após crescimento por 48 h a 28 °C, em meio NBY com kanamicina (50µg/mL), evidenciando a atividade do gene *gus*.

Com a ausência de “controle positivo” do mutante aleatório 30E9, devido à inviabilidade do uso do “complexo transposoma” para tal finalidade, a confirmação de inserção genômica da sequência do gene *nptII* foi realizada com a identificação do gene através de seqüenciamento.

Além de demonstrarem a presença da marca de seleção nas linhagens produzidas no estudo, as análises de *Southern blot* também confirmaram a inserção única do gene *nptII* presente no *transposon* EZ::TN<Kan-2> e do gene *aph* presente no plasmídeo suicida para a recombinação homóloga (dados não mostrados), como ilustrado para um dos mutantes aleatórios (30E9) (Figura 8).

A inserção única evidencia que houve o “rompimento” de apenas um gene e que, por isso, as conseqüências do evento podem ser relacionadas indiretamente, a esta seqüência.

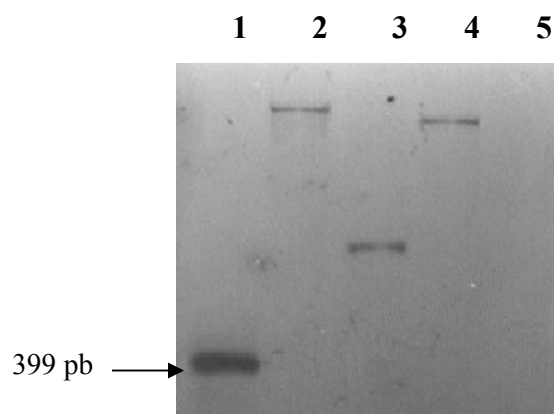


Figura 8. *Southern blot* empregando o gene *nptII* (399 pb) como sonda para confirmação de inserção única. (1) Controle positivo da sonda; DNA genômico total do mutante 30E9 (gene *xpsD*) de *Xac* 306 digerido com enzimas de restrição (2: *EcoRI*, 3: *EcoRV*, e 4: *NcoI*) e linhagem selvagem (5).

4.3. Identificação da atividade de degradação do composto carboximetilcelulose (CMC) dos mutantes

Após pré-seleção das 9423 colônias de mutantes obtidas por inserção aleatória do *transposon* (Figura 9), cerca de 672 linhagens que apresentaram alguma alteração na capacidade de degradação do composto CMC foram inoculadas no meio de cultura sólido com suspensão para formação de colônia individualizada.

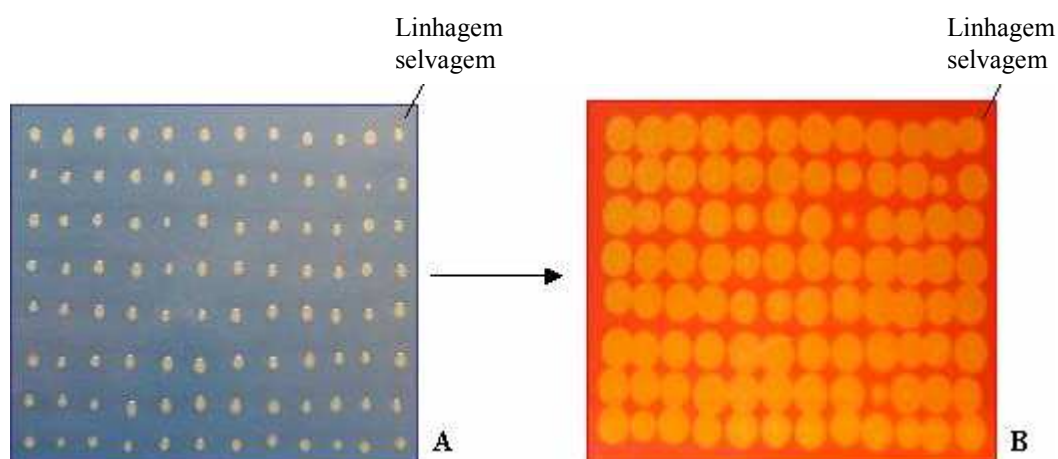


Figura 9. Seleção inicial de colônias mutantes de *Xac* para clone defeitivo em degradação de celulose, em placa de CMC. **A.** Placa de Petri com colônias em meio CMC, após 48 horas da inoculação; **B.** Halo de degradação de CMC em placas de Petri

após coloração com corante Vermelho do Congo (o halo amarelo indica a hidrólise da celulose).

Durante a fase pós-seleção, quando algumas colônias que inicialmente apresentaram alteração não mantiveram o mesmo comportamento, foi identificada uma colônia que manifestou alteração pronunciada de perfil de degradação de CMC, denominada linhagem 30E9, e que foi conduzida para análise mais detalhada, através de novos testes (Figura 10). As placas foram incubadas e, em seguida, coradas para uma terceira avaliação, a qual confirmou um mutante com fenótipo defectivo para atividade de CMCase e bastante significativo quanto à extensão do halo de degradação.

A linhagem não foi capaz de degradar o composto além do local do meio de cultivo onde a colônia foi depositada, ao contrário da linhagem selvagem, assim como também demonstrou menor capacidade de degradação de celulose, evidenciado pela menor intensidade de coloração induzida por corante específico para a presença de CMC.

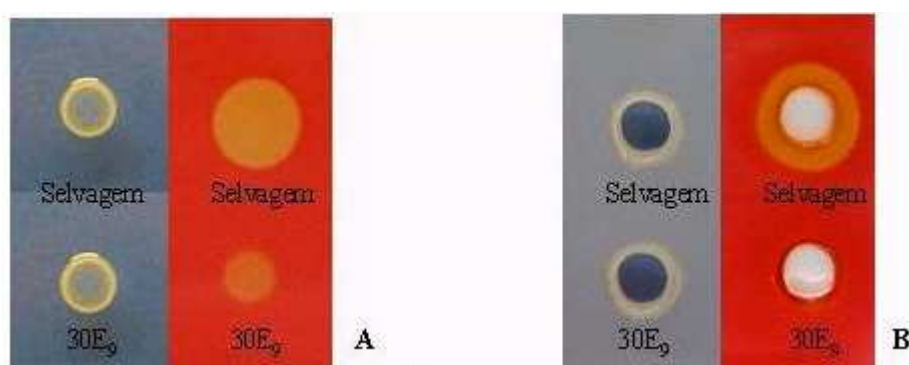


Figura 10. Mutante randômico selecionado após os testes de degradação do composto CMC em placas de Petri. **A.** Deposição de suspensão da linhagem selvagem e do mutante (após 48 horas inoculação), à esquerda, e halo de degradação de CMC, após coloração com corante Vermelho do Congo, à direita; **B.** Placa de Petri com suspensão bacteriana depositada em orifícios produzidos no meio CMC (48 horas após a inoculação), à esquerda, e coloração resultante de corante Vermelho do Congo, à direita.

Dentre os mutantes obtidos por recombinação homóloga simples, cinco linhagens apresentaram redução na zona de clareamento em placas de Petri com CMC, quando comparados à espécie selvagem, indicando que apresentaram alteração funcional para

degradação de celulose (linhagens 306ΔXAC0028, 306ΔXAC0029, 306ΔXAC2374, 306ΔXAC3516 e 306ΔXAC4231) (Figura 11).

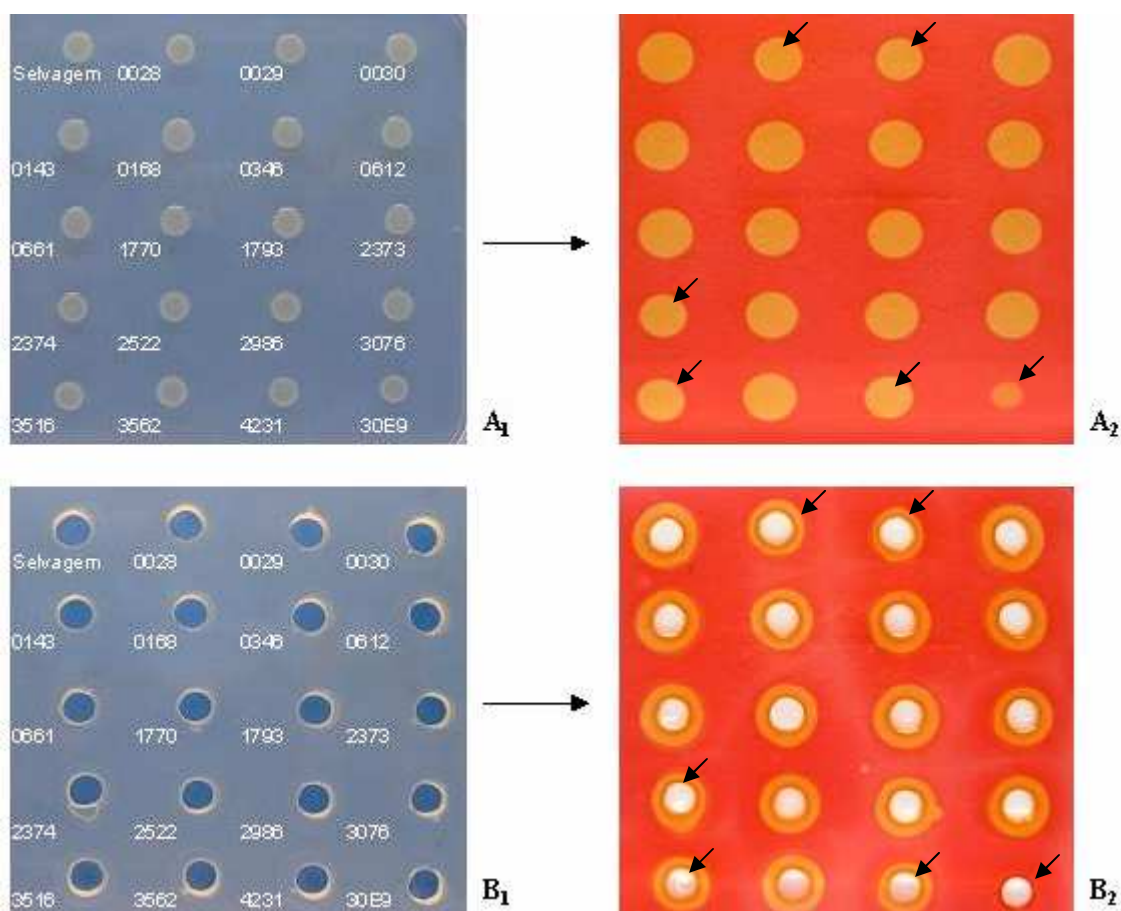


Figura 11. Mutantes sítio-dirigidos e aleatório (30E9) de *Xac* em placa de CMC. **A₁**. Placa de Petri com colônias crescidas em meio com CMC (48 horas após a inoculação); **A₂**. Halo de degradação de CMC em placas de Petri após coloração com corante Vermelho do Congo; **B₁**. Placa de Petri com colônias crescidas em orifícios produzidos no meio CMC (48 horas após a inoculação); **B₂**. Halo de degradação de CMC em placas de Petri após coloração com corante Vermelho do Congo. Setas indicam degradação diferenciada de CMC.

Uma vez que o diâmetro da zona de difusão é proporcional ao logaritmo da concentração da enzima (Wood et al., 1988), comparou-se o diâmetro do halo de degradação do composto CMC da linhagem selvagem com o dos mutantes adquiridos (Figura 12) e foi possível verificar que após 48 horas de inoculação todas as colônias apresentavam halo de 0,7 cm de diâmetro. Após a remoção das colônias e posterior

coloração com corante Vermelho do Congo a linhagem selvagem e alguns mutantes apresentaram em média halo de 1,1cm, enquanto que os mutantes 306ΔXAC0028, 306ΔXAC0029, 306ΔXAC2374, 306ΔXAC3516, 306ΔXAC4231 e 30E9 apresentaram em média diâmetro menor: 0,8 cm, 0,83 cm, 0,9 cm, 0,87 cm, 0,87 cm e 0,7 cm, respectivamente.

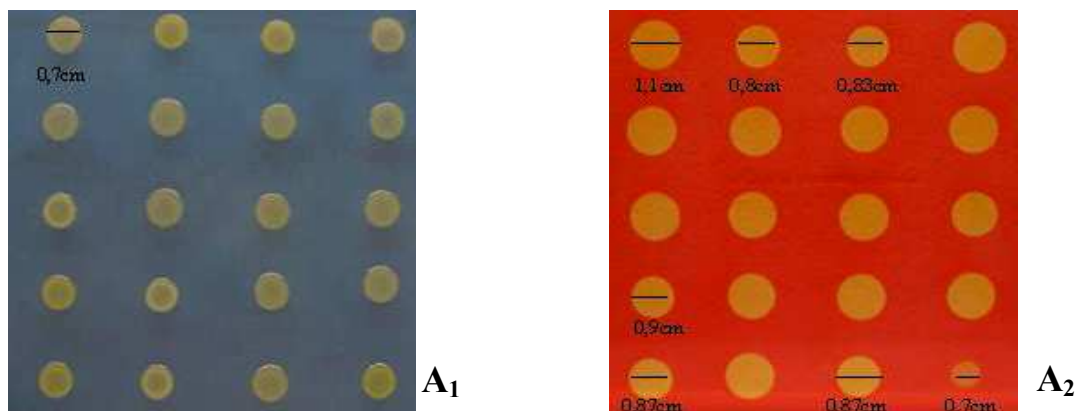


Figura 12. Placas de CMC evidenciando o diâmetro do halo de degradação da linhagem selvagem e dos mutantes produzidos. **A₁.** Placa de Petri com colônias em meio com CMC (48 horas após a inoculação); **A₂.** Halo de degradação de CMC em placas de Petri após coloração com corante Vermelho do Congo.

4.4. Identificação de mutantes aleatórios de *Xac* deficientes na degradação de celulose

Após a seleção e avaliação de mutantes de *Xac* com alteração da capacidade de degradação de celulose, foi possível observar que os mutantes obtidos por inserção aleatória de *transposon* apresentaram notável habilidade na degradação do composto CMC, com exceção da linhagem 30E9.

Para identificar o sítio de integração do *transposon*, foi determinada a sequência de DNA adjacente ao cassete do gene de resistência a kanamicina *nptII* para a linhagem 30E9, através da técnica “TAIL-PCR” (*Thermo Assimetric Interlaced-PCR*). Os sítios de inserção do cassete no genoma foram então localizados com procura por homologia de sequências através do programa BLAST (Altschul et al., 1997). Essa análise identificou o gene *xpsD*, pertencente ao *operon* *xps*, como responsável pela alteração de

fenótipo de degradação de CMC em placa. O *operon* codifica para proteínas integrantes do sistema de secreção do tipo II (Figuras 13 e 14).

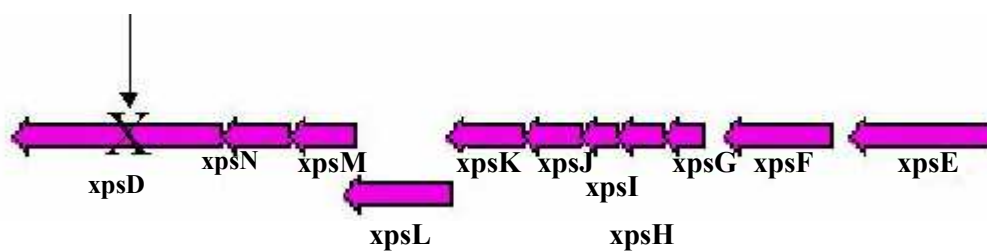


Figura 13. *Operon xps* presente em *Xac*. A seta indica o gene que foi mutado na extremidade *downstream*.

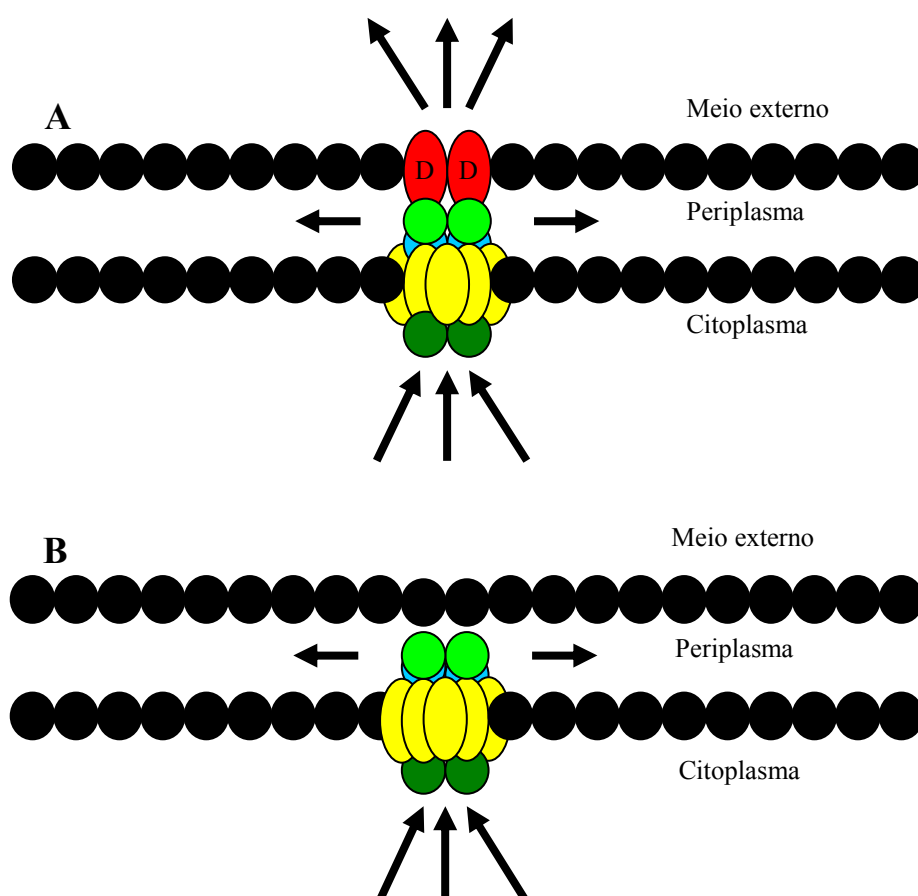


Figura 14. Esquema hipotético da montagem do sistema de secreção do tipo II na membrana plasmática de células de *Xac*, com setas indicando a direção de compostos

secretados. **A.** Presença de todas as proteínas do *operon xps*; **B.** Ausência da proteína XpsD.

Para a confirmação experimental de que o mutante 30E9 se refere à linhagem que apresenta o sistema de secreção incompleto, ou seja, sem a proteína responsável pela passagem de compostos secretados para além do periplasma, suspensões bacterianas cultivadas em meio líquido XVM2, foram centrifugadas, filtradas em membrana de 0,22µm, e colocadas em contato com o substrato CMC em placas de Petri (Figura 15). Em comparação à linhagem selvagem, a suspensão filtrada do mutante provocou apenas tênue degradação de celulose. Além disto, tal degradação ocorreu somente na superfície do meio onde a colônia apresentou crescimento, ou seja, no contato direto com o substrato.

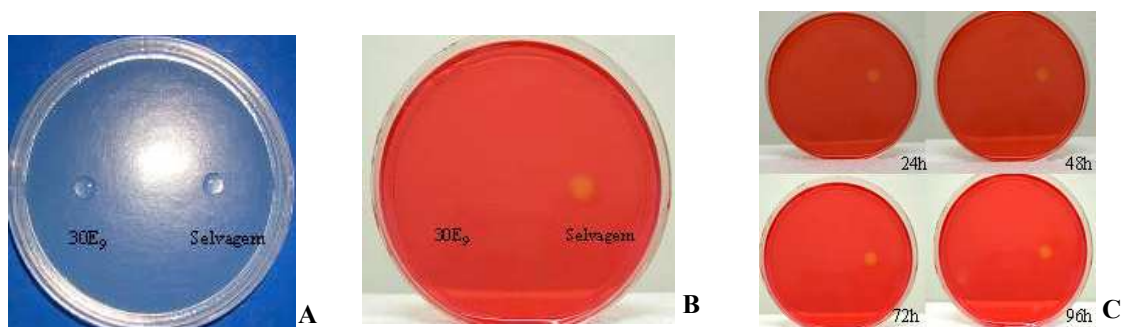


Figura 15. Placa de Petri com CMC e 7 µL dos sobrenadantes filtrados a partir do meio líquido XVM2 cultivado com as linhagens 30E9 e selvagem de *Xac*. **A.** Placa de Petri com a suspensão filtrada imediatamente após a deposição; **B.** Halo de degradação de CMC após coloração com corante Vermelho do Congo; **C.** Halo de degradação de CMC em placas de Petri 24h, 48h, 72h e 96h após a deposição da suspensão.

4.5. Patogenicidade dos mutantes em ensaio biológico

A resposta de *Xac* ao hospedeiro foi avaliada através da curva de crescimento dos mutantes comparados à linhagem selvagem. Nesta avaliação, a taxa de crescimento foi similar para todos os mutantes, na comparação à linhagem selvagem de *Xac* (Figura 16).

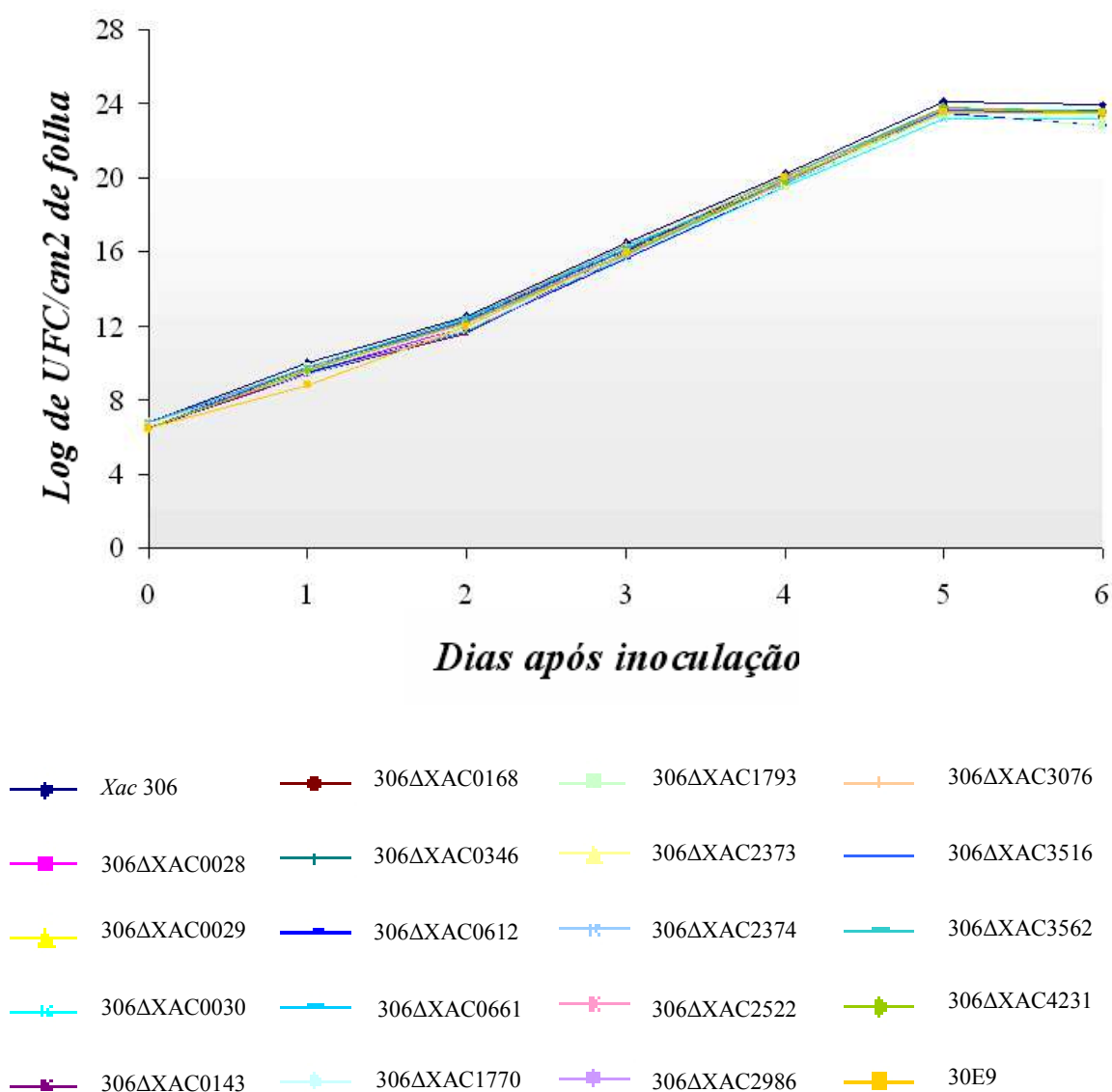


Figura 16. Curvas de crescimento em tecido foliar para as linhagens mutantes obtidas no estudo e linhagem selvagem de *Xac*.

Com os sintomas visuais sendo avaliados aos 7 (Figura 17) e 14 dias (Figura 18) após as inoculações, ou mesmo após 1 mês (Figura 19), as lesões em folhas da laranjeira Baía, inoculadas com clones sítio-dirigidos e conduzidas sob condições de casa-de-vegetação e em BOD (*in vitro*), não apresentaram alteração de patogenicidade (sintoma visual) significativa quando comparadas às lesões produzidas pela linhagem selvagem. Já as inoculações do mutante aleatório 30E9 provocaram alteração de patogenicidade (sintoma visual) significativa, quando comparadas à linhagem selvagem. Percebeu-se

que, para o mutante 30E9, o surgimento da hipertrofia, que é um dos principais indicativos da lesão de cancro cítrico, ocorreu em momento posterior àquele observado para a linhagem selvagem. Entretanto, os sintomas tornaram-se semelhantes ao longo do desenvolvimento da lesão.



Figura 17. Teste de patogenicidade em folhas da laranjeira Baía, realizado *in vivo*, mostrando o resultado das infiltrações com suspensões dos mutantes à esquerda da nervura central, e à direita a infiltração da linhagem selvagem, crescidos em meio de cultura XVM2, 7 dias após infiltração.



Figura 18. Teste de patogenicidade em folhas da laranjeira Baía, realizado *in vitro*, mostrando o resultado das infiltrações com suspensões dos mutantes à esquerda da nervura central, e à direita a infiltração da linhagem selvagem, crescidos em meio de cultura XVM2, 14 dias após infiltração.

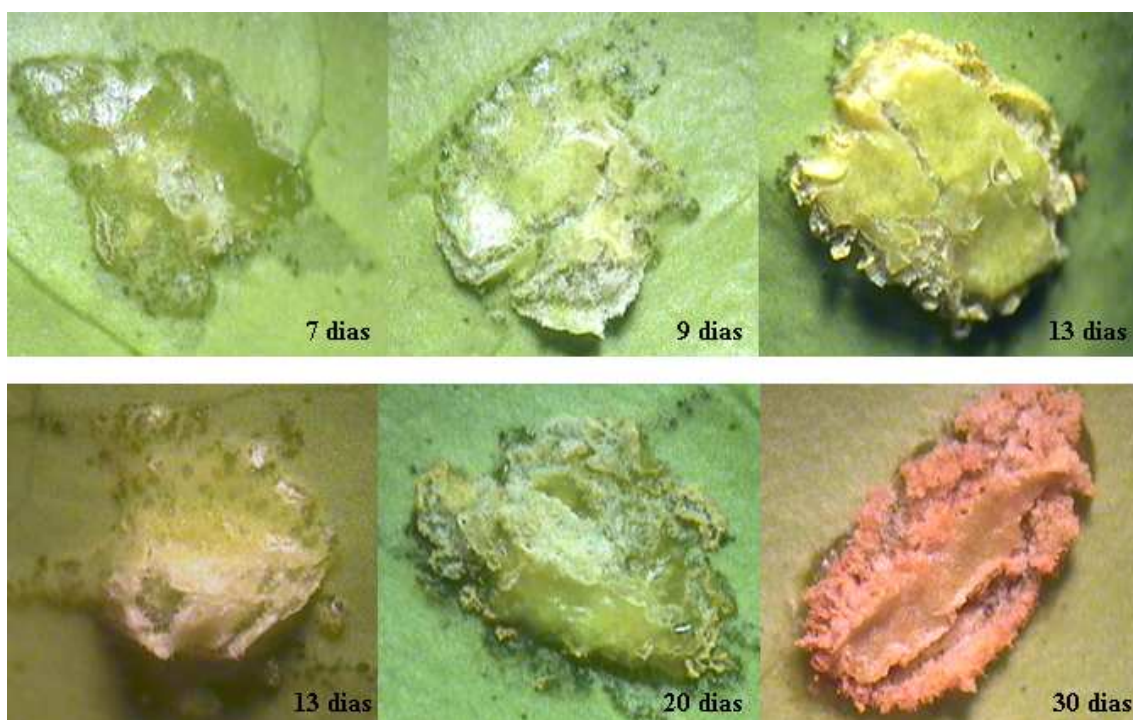


Figura 19. Teste de patogenicidade em folhas da laranjeira Baía, realizado *in vitro*, observado em lupa com sistema de vídeo acoplado, mostrando o resultado das infiltrações com suspensões da linhagem selvagem, crescidos em meio de cultura XVM2, em diferentes dias após infiltração.

5. DISCUSSÃO

A metodologia de formação de coleção de linhagens a partir do uso de mutagênese por *transposons*, ou seja, pela inserção aleatória de marca de seleção no genoma, como realizado neste estudo, mostrou-se capaz de produzir linhagens estáveis de *Xac*, ou seja, com alteração genética permanente. Tal metodologia foi utilizada satisfatoriamente para outros organismos também como parte de programa de genômica funcional, a exemplo de estudos com as bactérias *X. campestris* pv. *campestris* (Qian et al., 2005), *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae* (Sun et al., 2003), *X. fastidiosa* (Guilhabert et al., 2001), *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Kirchner et al., 2001) *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Brumbley et al., 2004), *Acinetobacter baumannii* (Dorsey et al., 2002), entre outros, que demonstraram a rápida identificação do gene afetado através do *screening* dos mutantes aleatórios como uma ferramenta bastante promissora nesse tipo de abordagem (Coelho et al., 2000).

Após insucesso de várias tentativas de mutagênese através da conjugação, a análise molecular da virulência de duas importantes bactérias fitopatogênicas, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, só foi possível a partir da produção de mutantes aleatórios via *transposon*, o que permitiu a geração de bibliotecas com 17000 e 18000 mutantes, respectivamente, por ser um sistema extremamente simples e altamente eficiente (com mais de 10^6 transformantes/ μg de *transposon* utilizado) (Sun et al., 2003).

Uma alta eficiência do sistema de mutagênese aleatória de *transposon* também foi obtida para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* com a inserção do elemento IS1409, obtendo-se uma taxa de transformação de aproximadamente 5×10^6 transformantes/ μg de DNA, o que gerou um banco de 8000 mutantes analisados e identificados com genes de importância relevante na interação patógeno-hospedeiro (Kirchner et al., 2001).

O isolado *X. campestris* pv. *campestris* 8004, resistente a rifampicina e derivado da linhagem *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB 1145, teve seu genoma completo seqüenciado, anotado e comparado com o isolado ATCC 33913 da mesma espécie (da Silva et al., 2002). Tal estudo revelou a conservação dos genes que compõe esses genomas, através de uma biblioteca de mutantes obtidos por inserção aleatória de *transposon* em larga escala como previamente já descrito, composta por 16512 clones, com saturação de 97% do genoma (ou 4 vezes de cobertura do genoma) (Sun et al., 2003).

Estes dados reforçam a qualidade da biblioteca de mutantes obtidos nesse estudo e a eficiência da metodologia usada para facilitar a identificação de genes relacionados à patogenicidade, bem como para permitir a análise funcional do genoma de *Xac*.

Embora a busca de mutantes por interesse específico dentro de uma população possa ser extremamente trabalhosa se o fenótipo afetado pelo gene de interesse não é facilmente identificado (Alberts et al., 2002), a ferramenta utilizada no presente estudo com *Xac* (mutagênese aleatória) permitiu produzir, com considerável velocidade, linhagens que possibilitaram a investigação de característica de difícil obtenção por outra forma, como a mutagênese direcional. Dentre os fatores que podem ter impedido que esta seleção identificasse maior número de linhagens, com alteração significativa na capacidade de degradar compostos celulósicos, está o número de colônias analisadas (9423 linhagens).

Para selecionar uma linhagem com propriedade tão específica, uma biblioteca ainda maior de mutantes deveria ser analisada. Existem métodos que podem auxiliar no cálculo do número de mutantes que devem ser produzidos para a cobertura do genoma de determinada espécie, através do cálculo da relação entre o número de colônias analisadas e a expectativa do sucesso para obtenção de mutantes de interesse (Reetz, 2002). Considerando-se que o *transposon* fosse distribuído aleatoriamente no genoma de um organismo qualquer, e com uma inserção única, sua probabilidade de ocorrência pode ser calculada pela fórmula: $P = 1 - (1 - X/G)^n$, onde “P” é a probabilidade de identificar-se um *transposon* inserido no gene de interesse, “X” é o comprimento do gene, “G” é o comprimento do genoma e “n” é o número de *transposons* inseridos na população presente (Sun et al., 2003). Para se encontrar o gene de interesse, com 95% de probabilidade, seria necessário uma biblioteca com 13254 clones. Como a proposta inicial previa a seleção de mutantes a partir de biblioteca de 3000 mutantes aleatórios (e depois acrescida com 6423 mutantes), isso mostra que as chances de terem sido encontrados todos os genes de interesse não foram totalmente exploradas neste estudo, o que pressupõe que novos genes ainda possam ser associados ao processo em questão.

Apesar de apenas um mutante com atividade diferenciada (30E9) ter sido selecionado dentre aqueles gerados a partir de inserção aleatória de *transposon*, acredita-se que com o refinamento do método de *screening* desenvolvido, para aumento da precisão na identificação visual de alteração em placa, será possível selecionar maior número de mutantes estáveis para a característica estudada.

Na mutagênese aleatória de *Xac* o mutante selecionado (30E9) também foi submetido à análise de *Southern blot*, confirmando a presença do *transposon* no genoma da bactéria. Além disto, tal dado identifica também que houve inserção de apenas um *transposon* no mutante, o que já se verificou em outros organismos submetidos à mesma técnica. Em *X. fastidiosa*, para confirmar o efeito da técnica, foram isolados dez mutantes obtidos por inserção de *transposon* e submetidos à análise de *Southern blot* usando o próprio cassete “<KAN-2>” como sonda. Os resultados indicaram que as inserções ocorreram como eventos simples e independentes (Guilhabert et al., 2001). No estudo da eficiência do sistema de mutagênese por *transposon* realizado em *X. campestris* pv. *campestris* e *X. oryzae* pv. *oryzae*, o evento de mutagênese também foi analisado por *Southern blot* mostrando que a quase totalidade dos clones testados apresentaram a inserção aleatória única do *transposon* (Sun et al. , 2003).

A técnica “TAIL-PCR” (*Thermo Assimetric Interlaced-PCR*) (Liu e Whittier, 1995; Liu et al., 1995) foi utilizada para identificar o sítio de integração do *transposon* e foi comprovada a coerência entre o gene identificado e o evento biológico estudado. O mutante obtido por inserção aleatória do *transposon* (30E9) representa a linhagem que não é capaz de produzir a proteína XpsD, codificada no *operon xps*. A proteína estrutural está localizada na “abertura” da maquinaria do sistema de secreção do tipo II e promove a interligação entre o citoplasma e o meio externo. Com o “desligamento” deste gene, sugere-se que o sistema não foi totalmente afetado, mas permitiu que compostos ficassem restritos ao espaço periplasmático.

Como o gene *xpsD* encontra-se no final do agrupamento gênico, o seu nocaute parece não ter promovido o desligamento de todo o sistema de secreção tipo II de *Xac*. Cabe lembrar que neste *operon*, e de forma geral em *operons* presentes em procariotos, a transcrição de todos os seus genes ocorre no mRNA policistrônico; por sua vez, estes genes utilizam os mesmos elementos regulatórios, como promotores e terminadores para todo o grupo. Enfim, supõe-se que a mutagênese ocorrida no sistema foi apolar, não modificando, assim, a transcrição dos demais componentes do agrupamento. Estudos indicaram que quando o gene *xpsD* presente no sistema de secreção tipo II foi interrompido, enzimas extracelulares como poligalacturonato liase, alfa-amilase e endoglucanase foram acumuladas no periplasma de *X. campestris* pv. *campestris* (Hu et al., 1995). Nesse estudo, porém, buscou-se apenas a identificação do acúmulo de endoglucanase, mais especificamente de celulase, não sendo realizados testes para as demais enzimas.

A filtração das suspensões bacterianas cultivadas em meio líquido XVM2, o qual induz a expressão de genes *hrp* (“hypersensitive reaction and pathogenicity”) comprovou que a (baixa) atividade CMCase do mutante 30E9 foi devida exclusivamente ao contato da superfície da célula bacteriana com o substrato pois na presença de produtos secretados pela bactéria mutante e na ausência de suas células não houve degradação do composto CMC.

O efeito incomum do desligamento do gene *xpsD* no atraso do surgimento de hipertrofia do tecido infectado não tem registro na literatura, sobretudo porque este sintoma tem sido altamente relacionado ao sistema de secreção do tipo III e suas proteínas efetoras (Duan et al., 1999). Por outro lado, novas evidências indicam que pode haver uma considerável interação entre os dois sistemas (II e III), a exemplo de *X. oryzae* pv. *oryzae*, em que um regulador gênico (HrpXo) do sistema de secreção do tipo III foi identificado também como regulador da secreção da enzima protease de cisteína, que é secretada pelo sistema de secreção do tipo II (Furutani et al., 2004).

O polímero carboximetilcelulose (CMC) não é transportado para o interior das células devido ao seu alto peso molecular. Assim, células que produzem CMCase (carboximetilcelulase) hidrolizam o CMC em placas de Petri e suas colônias podem ser facilmente reconhecidas pelo halo de degradação que as cercam após coloração com corante Vermelho do Congo, pois o halo amarelo indica a hidrólise da celulose, uma característica das endoglucanases (Kim et al., 2000). Nesse estudo com *Xac* a degradação do composto em regiões além do local da deposição da colônia evidenciou que a bactéria é realmente capaz de produzir endoglucanases e que estas são secretadas.

O fato da degradação de CMC em placas com ágar, para o mutante 30E9, ter sido muito “tênue” (isto é, com baixa intensidade de coloração) e ter ocorrido somente abaixo da colônia (ausência de halo de degradação além da colônia), ao contrário do que ocorreu para a linhagem selvagem e para os demais mutantes estudados, mostra que o mecanismo é limitado pela célula (Zorreguieta et al., 2000). Tal efeito também pode ser indicado pela filtração da suspensão bacteriana, isto é, a ausência de células no meio de cultivo com CMC e somente os compostos secretados: foi verificada a total ausência de halos formados a partir de áreas com a presença de enzimas degradadoras de celulose, porém o mesmo não ocorreu com as colônias selvagens.

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que células de *Xac* são capazes de hidrolisar compostos celulósicos, ou seja, apresentam a capacidade de degradar celulose do hospedeiro e esta propriedade pode atuar, de alguma forma, na adaptação do

fitopatígeno à planta de citros. Embora, estudos tenham sido realizados com outros microrganismos (Chatterjee et al., 1995; Zorreguieta et al., 2000; Zhou e Ingram, 2000; Spiridonov e Wilson, 2000; Chatterjee et al., 2002; Murashima et al., 2003), esta descoberta é inédita para *Xac* e compatível com a função que o sistema de secreção tipo II exerce em outras bactérias, ou seja, a secreção extracelular de enzimas hidrolíticas (Ball et al., 1999; Hu et al., 2002). O alto grau de homologia verificado entre os genes estudados neste ensaio e presentes em outras espécies de *Xanthomonas* demonstra a relevância de tal afirmação (Tabela 5).

Percebe-se a alta homologia com a maioria das ORFs anotadas como diretamente envolvidas na degradação de parede celular, o que indica que vários dos genes estudados são conservados no gênero e, assim, podem auxiliar na elucidação de mecanismos moleculares relacionados a patogenicidade e ampliar as possibilidades para possíveis redes de funcionamento celular de *Xac*.

Tabela 5. ORFs identificadas no genoma de *Xac* 306, anotadas como diretamente envolvidas na degradação de parede celular e homologia com outras espécies de *Xanthomonas*.

<i>Xac</i>	<i>X. campestris</i> pv. vesicatoria	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>X. campestris</i> pv. campestris
XAC0028	78034015* precursor de celulase (5e-164)**	58579906 celulase (1e-154)	21110966 celulase (2e-140)
XAC0029	78034017 precursor de celulase (6e-175)	58424499 celulase (2e-162)	21110968 celulase (3e-139)
XAC0030	78034019 precursor de celulase (0,0)	58424498 celulase (4e-179)	21110969 celulase (5e-148)
XAC0143	78034108 2-queto-3- deoxigluconate quinase (1e-140)	58579651 2-queto-3- deoxigluconato quinase (2e-139)	21111069 2-queto-3- deoxigluconato quinase (7e-137)
XAC0346	78034344 celulase (0,0)	58424499 celulase (5e-07)	21110968 celulase (5e-07)

XAC0612	78034656 precursor de endoglucanase extracelular (0,0)	58428236 celulase (0,0)	21114805 celulase (2e-22)
XAC0661	78034708 precursor de poligalacturonase (0,0)	58582322 poligalacturonase (7e-51)	21114720 endopoligalacturonase (0,0)
XAC1770	78035788 celulase (0,0)	—————	21112845 celulase (0,0)
XAC1793	78035809 precursor de glucano 1,4- beta-glucosidase (0,0)	84623895 glucano 1,4-beta- glucosidase (0,0)	77747847 glucano 1,4-beta- glucosidase (0,0)
XAC2373	78036555 pectato liase (0,0)	—————	21111648 pectato liase (2e-09)
XAC2374	78036557 precursor de poligalacturonase (0,0)	58582322 poligalacturonase (0,0)	21113405 poligalacturonase (0,0)
XAC2522	78036690 precursor de celulase (0,0)	—————	6572464 endo-1,4-beta-D- glucanase (0,0)
XAC2986	78037118 precursor de pectato liase (4e-161)	—————	21114006 pectato liase II (3e-180)
XAC3076	78037197 precursor de beta- glucosidase (0,0)	84623339 glucano 1,4-beta- glucosidase (0,0)	21114093 glucano 1,4-beta- glucosidase (0,0)
XAC3516	78037627 precursor de celulase (2e-104)	—————	—————
XAC3562	78037673 precursor de pectato liase (2e-179)	58580444 pectato liase (2e-149)	21111648 pectato liase (8e-170)
XAC4231	78038323 precursor de beta- glucosidase	58584046 glucano 1,4-beta- glucosidase	21115383 glucano 1,4-beta- glucosidase

	(0,0)	(0,0)	(0,0)
XAC3534	365389	6176558	636062
	XpsD	XpsD	XpsD
	(0,0)	(0,0)	(0,0)

(*) Código de identificação no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

(**) *E*-value

Seqüências gênicas identificadas no genoma de *X. fastidiosa* e possivelmente envolvidas na hidrólise da celulose e relacionadas à patogenicidade, virulência e adaptação apresentam homologia com seqüências de *Xac* (XAC0030, XAC0612, XAC2374 e XAC3076): Xf – 2708 (endo-1,4-beta-glucanase); Xf – 1267 (1,4-beta-cellobiosidase); Xf – 0818 (endo-1,4-beta-glucanase); Xf – 0810 (precursor de endoglucanase extracelular); Xf – 2466 (precursor de poligalacturonase); Xf – 0845 (hidrolase da família 3-glicoside). Essa similaridade poderia ser associada à proximidade evolutiva de ambas (Weels et al., 1987), sobretudo por serem bactérias fitopatogênicas que atuam sobre o mesmo hospedeiro.

Estudos sobre a função das seqüências gênicas Xf – 0810, Xf – 0818 e Xf – 2708 de *X. fastidiosa* através da expressão heteróloga em *E. coli* e, através de ensaios enzimáticos, demonstraram experimentalmente que as proteínas codificadas por estes genes apresentam atividade celulásica (endoglucanase) (Wulff, 2002). Dentre as três, a seqüência Xf – 0810 foi a que demonstrou atividade sobre maior gama de substratos, favorecendo seu posterior estudo na busca de seu possível envolvimento na degradação de fibras de celulose presentes nas membranas dos vasos pontuados do xilema de plantas de citros, comprovando que a degradação desta membrana permitiria a movimentação de células bacterianas entre os vasos do xilema, o que é determinante para o desenvolvimento dos sintomas da CVC (Cavalcanti, 2005).

As celulasas Xf – 0818 (3e-147) e Xf – 0810 (8e-50) são similares à engXCA de *X. campestris* pv. *campestris* (P19487), uma endoglucanase que exerce pequena função nos primeiros estágios da patogenicidade em nabo e rabanete (Gough et al., 1988; Gough et al., 1990) e corresponde a linhagem 306ΔXAC0612. Enquanto que a celulase Xf – 2708 (3e-104) é similar ao gene *egl* (celulase), correspondendo a linhagem 306ΔXAC0030. Por outro lado, a linhagem 306ΔXAC2374, similar à linhagem Xf – 2466 (2e-141), e que representa o gene *pglA*, uma poligalacturonase, apresentou

alteração no halo de degradação do composto CMC em placa. Esta última, porém, não foi abordada por Wulff (2002) no estudo com *X. fastidiosa*.

A linhagem 306ΔXAC2374, além de apresentar homologia com Xf – 2466, apresenta também homologia com outras poligalacturonases do gênero *Xanthomonas*: XCV2571 (precursora de poligalacturonase de *X. campestris* pv. vesicatoria), XCC2266 (poligalacturonase de *X. campestris* pv. campestris) e XOO2699 (poligalacturonase de *X. oryzae* pv. *oryzae*). Entretanto, não há relatos da participação direta de poligalacturonases no processo de danos ao tecido vegetal durante o processo de infecção bacteriana. A poligalacturonase catalisa a hidrólise das ligações β 1-4 entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia de pectina (Fischer e Bennett, 1991). Sua atividade tem sido identificada em vários frutos durante o amadurecimento, e se correlaciona com aumento de pectinas solúveis e amaciamento durante o amadurecimento (Ahrens e Huber, 1990). Dessa forma, assim como a celulase e a hemicelulase (xilanase), a poligalacturonase pertence ao grupo de enzimas hidrolíticas de “maceração” de tecido vegetal, ou seja, a destruição massiva do conjunto de células (Resende et al., 2004).

O outro mutante que apresentou alteração na degradação do composto CMC em placa corresponde à linhagem 306ΔXAC4231, a qual apresenta homologia com XCV4337 beta-glucosidase de *X. campestris* pv. vesicatoria str. 85-10, XOO4423 glucano 1,4-beta-glucosidase de *X. oryzae* pv. *oryzae* KACC10331 e XCC4106 glucano 1,4-beta-glucosidase de *X. campestris* pv. campestris str. ATCC 33913. A enzima beta-glucosidase catalisa a hidrólise de resíduos terminais não redutores nos beta-D-glucosídeos com liberação de beta-glucose, enquanto a glucano 1,4-beta-glucosidase é uma exoenzima com especificidade para hidrolizar ligações 1,4-beta-glucosídicas de 1,4-beta-D-glucanos resultando na remoção sucessiva de unidades de glucose. Ambas pertencem a família de glicosidases, que hidrolizam celulose cristalina em moléculas de açúcar solúvel. Nesta família, há uma variedade de subtipos de enzimas com diferentes especificidades de substratos, que devem trabalhar juntas para efetuar a hidrólise completa de celulose e se encontram em estruturas chamadas celulosomas (Park et al., 2001).

Este estudo considerou indiscriminadamente todas as ORFs que apresentaram homologia com genes que codificam para proteínas associadas, de alguma forma, à degradação de parede celular em outros organismos, tais como endoglucanases, celulases, poligalacturonases, glicohidrolases, pectato liases, precursores de glicanases e

glicosidasas. Além disso, ORFs que apresentaram baixa homologia com tais enzimas e mesmo ORFs com indicação de “erro de leitura”, como deleções.

Como a seleção inicial de ORFs do estudo para mutagênese direcional foi baseada em processo de anotação automática e manual, esta investigação pode ter envolvido ORFs que foram eventualmente resultantes de interpretação equivocada durante o processo de anotação, e incluídas na categoria em questão, ou seja, seqüências falsamente relacionadas à degradação ou excluídos genes que, verdadeiramente, desempenham tal função. Por outro lado, como não apresentam resultado experimental, podem atuar de forma crítica no processo, o que é de suma importância para o entendimento de uma doença, auxiliando no estudo da colonização do hospedeiro (Brumbley et al., 2004; Cho et al., 2006).

Em *Erwinia*, as enzimas que degradam a parede celular de plantas correspondem a uma produção de altos níveis de diversas exoenzimas, incluindo pectinases, celulasas e proteases, que além de degradar a parede celular liberam nutrientes para possibilitar o crescimento da bactéria, a qual apresenta necessidades variáveis de exoenzimas dependendo da espécie e subespécie (Barras et al., 1994; Pérombelon, 2002; Py et al., 1998; Thomson et al., 1999).

Dentre os genes com ação comprovada no presente estudo em *Xac* para a degradação de CMC, o gene *egl* (XAC0028) apresenta homologia com a endoglucanase CelZ presente em *E. chrysanthemi*, maior responsável pela hidrólise da carboximetilcelulase (Zhou e Ingram, 2000), enquanto que o outro homólogo, *egl* (XAC0029), apresenta semelhança com *X. campestris* pv. *vesicatoria*, *X. oryzae* pv. *oryzae* e *X. campestris* pv. *campestris*. Em *E. chrysanthemi* as duas endoglucanases (CelZ e CelY) são produzidas e afetam sinergicamente a hidrólise de CMC e de amórfos de celulose (Zhou e Ingram, 2000).

De forma geral, as linhagens de *Xac* originadas da mutagênese direcionada não produziram alterações visualmente drásticas na degradação de CMC, ou seja, ausência total do halo, em oposição a o que ocorre com *E. chrysanthemi* (Zhou et al., 2001), que tem nas enzimas CelZ e CelY a totalidade da degradação de celulose, com 95% e 5%, respectivamente, da atividade de CMCase. Esse estudo sugere que em *Xac* o evento não é resultante de apenas um, mas de pelo menos cinco genes.

Curiosamente, embora em *E. chrysanthemi* a enzima CelZ seja o principal componente da degradação de celulose, a maior semelhança com *Xac*, dentre aqueles genes mutados direcionalmente e que evidenciaram alteração na característica estudada,

foi verificada entre a sequência da enzima CelY, de menor atividade naquele organismo (Zhou & Ingram, 2001), e o gene *bcsZ* ou a linhagem 306ΔXAC3516.

Estudo realizado com *Xac* e uso do meio XVM2 (Astua-Monge et al., 2005) demonstrou, dentre vários genes de patogenicidade expressos, a expressão destes dois genes (XAC0028 e XAC0029) e do gene XAC2373, que estão fortemente relacionados a enzimas degradadoras de parede celular. O mesmo estudo sugere que um sistema sinalizador alternativo possa existir regulando tais enzimas em *Xac*. Por outro lado, sabe-se que a biossíntese de polímeros extracelulares em *R. solanacearum* e em *X. campestris* pv. *campestris* é ativada em estádios tardios da infecção, o que poderia relacionar-se com a aderência da bactéria na superfície da célula vegetal, liberando enzimas que degradam polissacarídeos da parede, promovendo o estabelecimento de agregados, aumentando a habilidade da bactéria em utilizar nutrientes da planta como fonte de energia e ativando o próprio funcionamento do sistema de secreção tipo III.

O aumento da atividade de CelZ no substrato modificado por CelY é provavelmente o resultado do incremento na taxa de produção de substratos menores e rapidamente difusíveis. Funcionalmente, CelZ (*E. chrysanthemi*) e Xf – 0818 apresentam similaridades, embora não tenha sido observado sinergia entre as celulasas de *X. fastidiosa* (Wulff, 2002).

Tais fatos sugerem que também em *Xac* a ação de degradação pode, eventualmente, estar associada a poucas enzimas. Além disso, a sintomatologia associada à formação das doenças causadas por estes dois patógenos (*Erwinia* spp. e *Xac*) é extremamente diferenciada. Enquanto plantas afetadas por *Erwinia* promovem a “maceração” drástica do tecido, o que caracteriza o principal mecanismo utilizado por este gênero de fitopatógenos (Toth et al., 2003), o cancro cítrico se apresenta com a ocorrência de lesões pontuais.

Por outro lado, mesmo essas celulasas de *Erwinia* (CelZ e CelY), ao contrário de suas pectinases, parecem desempenhar papel menor na patogenicidade. Foi demonstrado que em *E. chrysanthemi* diferentes pectinases foram requeridas para virulência em diferentes hospedeiros: uma mutação no gene *pelD* (uma das pectinases envolvidas com patogenicidade) reduziu a virulência em folhas de chicória, mas não em tubérculos de batata, enquanto que uma mutação no gene *pelE* aumentou a virulência em ambos os hospedeiros (Beaulieu et al., 1993; Toth et al., 2003).

Dessa forma, embora o genoma completo de *Xac* tenha permitido a identificação de informações genéticas para a exploração de suas características biológicas, funções

de seqüências importantes que codificam para proteínas precisam ser designadas, assim como grande número de genes, incluindo determinantes de virulência, até então não definidos experimentalmente. Em suma, este estudo demonstra experimentalmente que a bactéria *Xac* é capaz de degradar composto celulósico. Além disso, pelo menos cinco de seus genes, ou seja, as linhagens 306ΔXAC0028, 306ΔXAC0029, 306ΔXAC2374, 306ΔXAC3516 e 306ΔXAC4231, são diretamente ligados a esta degradação e que o *operon xps*, do sistema de secreção do tipo II, participa deste processo, embora não haja efeito drástico destes genes na capacidade do patógeno em causar a doença na planta hospedeira.

6. CONCLUSÕES

- ⌘ As metodologias de formação de mutantes através da mutagênese dirigida e mutagênese por *transposons* mostraram-se capazes de produzir linhagens estáveis de *Xac*, ou seja, com alteração genética permanente.
- ⌘ A proteína XpsD, codificada no *operon xps* e presente no genoma da bactéria, é funcional.
- ⌘ Células de *Xac* são capazes de hidrolisar compostos celulósicos, ou seja, apresentam a atividade de celulasas, capazes de degradar celulose do hospedeiro.
- ⌘ Pelo menos cinco genes de *Xac* estão diretamente ligados à degradação de composto celulósico: as linhagens 306ΔXAC0028, 306ΔXAC0029, 306ΔXAC2374, 306ΔXAC3516 e 306ΔXAC4231.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abecitrus: Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos. 2006. Disponível em: <<http://www.abecitrus.com.br>>. Acesso em março 2006.

Abracen: Associação Brasileira das Centrais de Abastecimento. 2006. Disponível em: <<http://www.abracen.org.br>>. Acesso em fevereiro 2006.

Ahrens, M. J.; Huber, D. J. Physiology and firmness determination of ripening tomato fruit. **Physiologia Plantarum**, v.78, p.8-14, 1990.

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. **Molecular biology of the cell**. 4ed. New York: Garland Science, 2002, 1463p.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.

Amaral, A. M. do; Toledo, C. P.; Baptista, J. C.; Machado, M. A. Transformation *Xanthomonas axonopodis* pv. citri by eletroporation. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 292-294, 2005.

Amaral, A. M. do. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. **Comunicado Técnico** 86, ISSN 0102-0099, Brasília – DF, nov. 2003.

Astua-Monge, G.; Freitas-Astua, J.; Bacocina, G.; Roncoletta, J.; Carvalho, S. A.; Machado, M. A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.3, p.1201-1205, 2005.

Astua-Monge, G., Minsavage, G. V., Stall, R. E., Davis, M. J., Bonas, U., Jones, J. B. Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria is specified by a plant inducible virulence gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, p.911-921, 2000.

Ball, G.; Chapon-Hervé, V.; Bleves, S.; Michel, G.; Bally, M. Assembly of XcpR in the cytoplasmic membrane is required for extracellular protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v.181, p.382-388, 1999.

Barras, F.; van Gijsegem, F.; Chatterjee, A.K. Extracellular enzymes and pathogenesis of the soft rot *Erwinia*. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.201-234, 1994.

Bauklard, A.; Kremer, L.; Locht, C. Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.11, p.3091-3098, 1996.

Beaulieu, C.; Boccara, M.; Van Gijsegem, F. Pathogenic behavior of pectinase-defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.197-202, 1993.

Béguin, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p.219-248, 1990.

Belasque Júnior, J. **Dinâmica espacial do cancro cítrico, interação com a larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*) e diversidade genética do seu agente causal (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)**. 2005. 171p. Tese (Doutorado em Agronomia) – USP/ESALQ, Piracicaba, 2005.

Belasque Júnior, J.; Nociti, L. A. S.; Francischini, F. J. B.; Rodrigues Neto, J. Período de incubação e diâmetro de lesões em função de concentrações de inóculo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em folhas destacadas de limão cravo. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.1, p.52, 2003.

Bitancourt, A. A. O cancro cítrico. **Biológico**, v.23, p.101-111, 1957.

Boher, B.; Nicole, M.; Potin, M.; Geiger, J. P. Extracellular polysaccharides from *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* interact with cassava cell walls during pathogenesis. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.10, n.7, p.803-811, 1997.

Bok, J. D.; Yernool, D. A.; Eveleigh, D. E. Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p.4774-4781, 1998.

Bonas, U.; Ackerveken, G. V. D.; Büttner, D.; Hahn, K.; Marois, E.; Nennstiel, D.; Noel, L.; Rossier, O.; Szurek, B. How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host. **Molecular Plant Pathology**, v.1, n.1, p.73-76, 2000.

Brasileiro, A. C. M.; Carneiro, V. T. C. **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p.101-103, 1998.

Brown, I. R.; Mansfield, J. W.; Taira, S.; Roine, E.; Romantschuk, M. Immunocytochemical localization of HrpA and HrpZ supports a role for the Hrp pilus in the transfer of effector proteins from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* across the host plant cell wall. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, p.394-404, 2001.

Brumbley, S. M.; Petrasovits, L. A.; Murphy, R. M.; Nagel, R. J.; Candy, J. M.; Hermann, S. R. Establishment of a functional genomics platform for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.175-183, 2004.

Brumbley, S. M.; Petrasovits, L. A.; Birch, R. G.; Taylor, P. W. J. Transformation and transposon mutagenesis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease of sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.15, n.3, p.262-268, 2002.

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.

Cancro cítrico em viveiro telado. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, n.131, p.8-9, nov/dez, 2005.

Cancro é maior em quintais e residências. **Revista do Fundecitrus**, Araraquara, n.131, p.10, nov/dez, 2005.

Castañeda, A.; Reddy, J. D.; El-Yacoubi, B.; Gabriel, D. W. Mutagenesis of all eight avr genes in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* had no detected effect on pathogenicity, but one avr gene affected race specificity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, n.12, p.1306-1317, 2005.

Cavalcanti, L. S. **Papel da celulase Xf – 0818 na interação *Xylella fastidiosa* X citros**. 2005. 117p. Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração Fitopatologia) - USP/ESALQ, Piracicaba, 2005.

Chatterjee, A.; Cui, Y.; Chatterjee, A. K. RsmA and the quorum-sensing signal, N-[3-Oxohexanoyl] - L-Homoserine Lactone, control the levels of *rsmB* RNA in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by affecting its stability. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.15, p.4089-4095, 2002.

Chatterjee, A.; Cui, Y.; Liu, Y.; Dumenyo, C. K.; Chatterjee, A. K. Inactivation of *rsmA* leads to overproduction of extracellular pectinases, cellulases, and proteases in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in the absence of the starvation/cell density-sensing signal, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p.1959-1967, 1995.

Cho, Y.; Davis, J. W.; Kim, K.-H.; Wang, J.; Sun, Q.-H.; Cramer Jr., R. A.; Jr., Lawrence, C. B. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.19, n.1, p.7-15, 2006.

Coelho, P. S. R.; Kumar, A.; Snyder, M. Genome-wide mutant collections: toolboxes for functional genomics. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, p.309-315, 2000.

Cui, Y.; Chatterjee, A.; Chatterjee, A. K. Effects of the two-component system comprising GacA and GacS of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on the production of global regulatory rsmB RNA, extracellular enzymes, and harpinEcc. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, n.4, p.516-526, 2001.

Davies, G. J.; Wilson, K.S.; Henrissat, B. Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. **Biochemical Journal**, v.321, part 2, p.557-559, 1997.

Davies, F. S.; Albrigo, L. G. **Citrus**. Wallingford: CAB International, 1994, 254p.

De Feyter, R.; Yang, Y.; Gabriel, D. W. Gene-for-gene interactions between cotton R genes *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.6, p.225-237, 1993.

DebRoy, S.; Thilmony, R.; Kwack, Y.-B.; Nomura, K.; He, S. Y. A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants **Proceedings of the National Academy of Science of the U S A**, v.101, n.26, p.9927-9932, 2004.

Dorsey, C. W.; Tomaras, A. P.; Actis, L. A. Genetic and phenotypic analysis of *Acinetobacter baumannii* insertion derivatives generated with a transposome system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.12, p.6353-6360, 2002.

Dow, J. M.; Daniels, M. J. *Xylella fastidiosa* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, v.17, n.4, p.263-271, 2000.

Dow, M.; Newman, M.; Roepenack, E. von. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, p.241-261, 2000.

Duan, Y. P.; Castaneda, A. L.; 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.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Citrus fruit fresh and processed: annual statistics. 2004. Disponível em: <<http://apps.fao.org> > Acesso em fevereiro 2006.

Fischer, R. L.; Bennett, A. B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42, p.675-703, 1991.

Fong, F. C. -F.; Doi, R. H. Characterization and comparison of *Clostridium cellulovorans* endoglucanases-xylanases EngB and EngD hyperexpressed in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.4, p.1403-1409, 1992.

Francischini, F. J. B.; Bonini, M.; Belasque Júnior, J.; Rodrigues Neto, J. Detecção e diagnose do cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. citri) em folhas destacadas de limão cravo. **Summa Phytopathologica**, v.29, n.1, p.52-52, 2003.

Fundecitrus: Fundo de Defesa da Citricultura. 2006. Disponível em: <http://www.fundecitrus.com.br> >. Acesso em fevereiro de 2006.

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.1374-1380, 2004.

Gaurivaud, P.; Souza, L. C. A.; Virgílio, A. C. D.; Mariano, A. G.; Palma, R. R.; Monteiro, P. B. Gene disruption by homologous recombination in the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p.4658-4665, 2002.

Gilkes, N. R.; Henrissat, B.; Kilburn, D. G.; Miller, R. C. Jr.; Warren, R. A. J. Domains in microbial α -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. **Microbiological Reviews**, v.55, n.2, p.303-315, 1991.

Goto, M.; Kumar, J.; Chaube, H.S.; Singh, U. S.; Mukhopadhyay, A. N. (Eds.). Citrus canker. In: **Plant diseases of international importance**. Englewood: Prentice-Hall. p.250-269, 1992.

Gough, C. L.; Dow, J. M.; Keen, J.; Henrissat, B.; Daniels, M. J. Nucleotide sequence of the *engXCA* gene encoding the major endoglucanase of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Gene**, v.89, n.1, p.53-59, 1990.

Gough, C. L.; Dow, J. M.; Barber, C. E.; Daniels, M. J. Cloning of two endoglucanases genes of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenicity. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.1, p.275-281, 1988.

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

Guilhabert, M. R.; Hoffman, L. M.; Mills, D. A.; Kirkpatrick, B. C. Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes molecular **Plant-Microbe Interaction**, v.14, p.701–706, 2001a.

Guilhabert, M. R.; Hoffman, L. M.; Mills, D. A.; Kirkpatrick, B. C. EZ::TNTM TransposomesTM: A novel system for identifying genes involved in bacterial pathogenesis. **Epicentre Forum**, v.8, n.2, p.1-3, 2001b.

Hacker, J.; Kaper, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. v.54, p.641-679, 2000.

Hamilton, H. L.; Schwartz, K. J.; Dillard, J. P. Insertion-duplication mutagenesis of *Neisseria*: use in characterization of DNA transfer genes in the gonococcal genetic island. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.16, p.4718-4726, 2001.

Hasse, G. **A laranja no Brasil**. São Paulo: Edição de Duprat & Iobe Propaganda, 1987, p. 37-41.

Hauck, P.; Thilmony, R.; He, S. Y. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, v.100, n.14, p.8577-8582, 2003.

Henrissat, B.; Bairoch, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v.293, part 3, p.781-788, 1993.

Henrissat, B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v.280, part 2, p.309-316, 1991.

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.; 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. **Biochemical Journal**, v.365, p.205-211, 2002.

Hu, N.-T.; Hung, M. N.; Liao, C. T.; Lin, M. H. Subcellular location of xpsD, a protein required for extracellular protein secretion by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Microbiology**, v.141, p.1395-406, 1995.

IEA. **Levantamento Subjetiva Estado de São Paulo**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br>>. Acesso em 10 de janeiro de 2005.

Irey, M.; Gottwald, T.; Graham, J.; Carlton, G.; Riley, T. Post-hurricane analysis of citrus canker spread and progress towards the development of a predictive model for future weather related spread. **International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, 2**, Flórida, Crowne Plaza Orlando International, p.15, 2005.

Jahr, H.; Dreier, J.; Meletzus, D.; Bahro, R.; Eichenlaub, R. The Endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.7, p.703-714, 2000.

Jahr, H.; Bahro, R.; Burger, A.; Ahlemeyer, J.; Eichenlaub, R. Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. **Environmental Microbiology**, v.1, n.2, p.113-118, 1999.

Jha, G.; Rajeshwari, R.; Sonti, R. V. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.18, n.9, p.891-898, 2005.

Kanamori, H.; Tsuyumu, S. Comparison of nucleotide sequence of canker-forming and non-canker-forming *pthA* homologues in *Xanthomonas campestris* pv. citri. **Annual of the Phytopathology Society of Japan**, n.64, p.462-470, 1998.

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

Kim, Y. S.; Jung, H. C.; Pan, J. G. Bacterial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulose variants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.2, p.788-793, 2000.

Kimati, H.; et al. **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997, p.270.

Kirchner, O.; Gartemann, K.H.; Zellermann, E. M.; Eichenlaub, R.; Burger, A. A highly efficient transposon mutagenesis system for the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.14, n.11, p.1312-1318, 2001.

Kono, H.; Waelchli, M.R.; Fujiwara, M.; Erata, T.; Takai, M. Transglycosylation of cellobiose by partially purified *Trichoderma viride* cellulase. **Carbohydrate Research**, v.319, n.1-4, p.29–37, 1999.

Laine, M. J.; Haapalainen, M.; Wahlross, T.; Kankare, K.; Nissinen, R.; Kassuwi, S.; Metzler, M. C. The cellulase encoded by the native plasmid of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* plays a role in virulence and contains an expansin-like domain. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.57, n.5, p.221-233, 2000.

Lee, H. M.; Tyan, S.W.; Leu, W. M.; Chen, L. Y.; Chen, D. C.; Hu, N. T. Involvement of the XpsN protein in formation of the XpsL-XpsM complex in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.2, p.528-535, 2001.

Lee, M. S.; Seok, C.; Morrison, D. A. Insertion-duplication mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion tool. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p.4796-4802, 1989.

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

Lim, M. T. S.; Kunkel, B. N. Mutations in the *Pseudomonas syringae* *avrRpt2* gene that dissociate its virulence and avirulence activities lead to decreased efficiency in AvrRpt2-induced disappearance of RIN4. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, n.3, p.313-321, 2004.

Liu, H.; Zhang, S.; Schell, M. A.; Denny, T. P. Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.18, n.12, p.1296–1305, 2005.

Liu, Y. G.; Mitsukawa, T.; Oosumi, T.; Whittier, R. F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. **Plant Journal**, v.8, p.457-463, 1995.

Liu, Y. G.; Whittier, R. F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. **Genomics**, v.25, n.3, p.674-681, 1995.

Lynd, L. R.; Weimer, P. J.; Willem, H. V. Z.; Pretorius, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p.506-577, 2003.

Mäe, A.; Heikinheimo, R.; Palva, E.T. Structure and regulation of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* SCC3193 Cellulase gene *celVI* and the role of cellulase in phytopathogenicity. **Molecular and General Genetics**, v.247, n.1, p.17-26, 1995.

Mattos Junior, D. de; de Negri, J. D.; Pio, R. M.; Pompeu Junior, J. **Citros**. Campinas-SP, Instituto Agronômico e Fundag, 2005, 929p.

Marois, E.; Van den Ackerveken, G.; Bonas, U. The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, n.7, p.637-646, 2002.

Matsumoto, H.; Jitareerat, P.; Baba, Y.; Tsuyumu, S. Comparative study of regulatory mechanisms for pectinase production by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.16, n.3, p.226-237, 2003.

Meletzus, D.; BERPohl, A.; Dreier, J.; Eichenlaub, R. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* NCPPB382. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.7, p.2131-2136, 1993.

Minsavage, G. V.; Mudgett, M. B.; Stall, R. E.; Jones, J. B. Importance of *opgH* (*Xcv*) of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in host-parasite interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v.17, n.2, p.152-161, 2004.

Monteiro, P. B.; Teixeira, D. C.; Palma, R. R.; Garnier, M.; Bové, J. M.; Renaudin, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.2263-2269, 2001.

Moreira, L. M.; de Souza, R. F.; Almeida Jr, N. F.; Setubal, J. C.; Oliveira, J. C. F.; Furlan, L. R.; Ferro, J. A.; da Silva, A. C. R. Comparative Genomics Analyses of Citrus-Associated Bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.42, p.163-184, 2004.

Murashima, K.; Kosugi, A.; Doi, R. H. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.5, p.1518-1524, 2003.

Namekata, T.; Rossi, A. C.; Ceravolo, L. C. Avaliação de novos métodos de erradicação de CC. **Laranja**, v.17, n.1, p.67-78, 1996.

Nankai, H.; Hashimoto, W.; Miki, H.; Kawai, S.; Murata, K. Microbial system for polysaccharide depolymerization: enzymatic route for xanthan depolymerization by *Bacillus* sp. strain GL1. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.6, p.2520-2526, 1992.

Neto, J. F. S.; Koide, T.; Gomes, S. L.; Marques, M. V. Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v.210, n.1, p.105-110, 2001.

Neves, E. M.; Dayoub, M.; Dragone, D. S.; Neves, M. F. Citricultura Brasileira: Efeitos Econômicos-financeiros 1996-2000. **Comunicação Científica**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v.23, n.2, p.432-436, agosto 2001.

Okinaka, Y.; Yang, C. H.; Perna, N. T.; Keen, N. T. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that are regulated during plant infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, n.7, p.619-629, 2002.

Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Nery, I. A.; Aguiar, C. L.; Pacheco, T. A. R. C. Enrichment of isoflavone aglycones in extracted soybean isoflavones by heat and fungal β -glucosidase. **Food and Science Industry**, v.34, n.4, p.14-19, 2001.

Pelczar, M. J. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. **Microbiologia**: conceitos e aplicações, v.1, 2^a edição. São Paulo: MAKRON Books, 1996, 334p.

Pérombelon, M. C. M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. **Plant Pathology**, v.51, p.1-12, 2002.

Pierson III, L.S.; Wood, D.W.; Pierson, E.A. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.207-225, 1998.

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

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

Py, B.; Barras, F.; Harris, S.; Robson, N.; Salmond, G. P. C. Extracellular enzymes and their role in *Erwinia* virulence. **Methods in Microbiology**, v.27, p.157-168, 1998.

Qian, W.; Jia, Y.; Ren, S. X.; He, Y. Q.; Feng, J. X.; Lu, L. F.; Sun, Q.; Ying, G.; Tang, D. J.; Tang, H.; Wu, W.; Hao, P.; Wang, L.; Jiang, B. L.; Zeng, S.; Gu, W. Y.; Lu, G.; Rong, L.; Tian, Y.; Yao, Z.; Fu, G.; Chen, B.; Fang, R.; Qiang, B.; Chen, Z.; Zhao, G. P.; Tang, J. L.; He, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, v.15, p.757-767, 2005.

Raven, P.H.; Evert R.F.; Curtis, H. **Biologia vegetal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1976. 724p.

Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichhorn, S.E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 2001. 906p.

Reetz, M. T. Directed evolution of selective enzymes and hybrid catalysts. **Tetrahedron**, v.58, n.32, p.6595-6602, 2002.

Resende, J. M.; Chitarra, M. I. F.; Maluf, W. R.; Chitarra, A.B.; Saggin Junior, O. J. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.206-212, 2004.

Roberts, D. P.; Denny, T. P.; Schell, M. A. Cloning of the Egl gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v.170, n.4, p.1445-1451, 1988.

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

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.

SAA/SP (Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo). Disponível em: <<http://www.agroportal.sp.gov.br/>> . Acesso em fevereiro de 2006.

Saarilahti, H. T.; Henrissat, B.; Palva, E. T. CelS: a novel endoglucanase identified from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. **Gene**, v.90, n.1, p.9-14, 1990.

Salmond, G.P.C. Secretion of extracellular virulence factors by plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.181-200, 1994.

Salmond, G. P.; Reeves, P. J. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. **Trends in Biochemical Science**, v.18, p.7-12, 1993.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.

Sandkvist, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.69, n.6, p.3523-3535, 2001.

Schubert, T. S.; Sun, X. Bacterial citrus canker. Florida Department of Agriculture & Conservancy Services, (Plant Pathology Circular, 377), 2003. 6p.

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.

Schülein, M. Protein engineering of cellulases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1543, n.2, p.239-252, 2000.

Schulte, R.; Bonas, U. Expression of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria *hrp* cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.815-823, 1992.

Scott, M. E.; Dossani, Z. Y.; Sandkvist, M. Directed polar secretion of protease from single cells of *Vibrio cholerae* via the type II secretion pathway. **Proceedings of the National Academy Science of the USA**, v.98, p.13978-13983, 2001.

Shaw, J. J.; Khan, I. Efficient transposon mutagenesis of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* by high-voltage electroporation. **Biotechniques**, v.14, p.556-558, 1993.

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.

da Silva, A. C. R.; Ferro, J. A.; Reinach, F.C. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.417, n.6887, p.459-463, 2002.

da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. A. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. B. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-Dorry, J. B. Faria, A. J. S. Ferreira, R. C. C. Ferreira, M. I. T. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, Jr., E. G. M. Lemos, M. V. F. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. B. N. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. M. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. M. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, Jr., A. Rossi, J. A. D. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. F. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. D. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal, J. P. Kitajima. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, v.417, p.459-463, 2002.

da Silva, F. R.; Vetore, A. L.; Edson, L. K.; Leite, A.; Arruda, P. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.203, n.2, p.165-171, 2001.

Spiridonov, N. A.; Wilson, D. B. A *celR* mutation affecting transcription of cellulase genes in *Thermobifida fusca*. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.1, p.252-255, 2000.

Stall, R. E., Miller, J. W., Marco, G. M., Canteros de Echenique, B. I. C. Timing of sprays to control canker of grapefruit in Argentina. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, v.1, p.414-417, 1981.

Sun, Q.; Wu, W.; Qian, W.; Hu, J.; Fang, R.; He, C. High-quality mutant libraries of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pv. *campestris* generated by an efficient transposon mutagenesis system. **FEMS Microbiology Letters**, v.226, p.145-150, 2003.

Suvendra, K.; Rajeshwari, R.; Sonti, R. V. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.13, n.4, p.394–401, 2000.

Szurek, B.; Rossier, O.; Hause, G.; Bonas, U. Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. **Molecular Microbiology**, v.46, n.1, p.13-23, 2002.

Swarup, S.; Yang, Y.; Kingsley, M. T.; Gabriel, D. W. An *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence on nonhosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.5, p.204-213, 1992.

Swarup, S.; de Feyter, R.; Bransky, R. H.; Gabriel, D. W. A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars to elicit canker-like lesions on citrus. **Phytopathology**, v.81, p.802-809, 1991.

Teather, R. M.; Wood, P. J. Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.4, p.777-780, 1982.

Thanassi, J. A.; Hartman-Neumann, S. L.; Dougherty, T. J.; Dougherty, B. A.; Pucci, M. J. Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.30, n.14, p.3152-3162, 2002.

Thomson, N. R.; Thomas, J. D.; Salmond, G. P. C. Virulence determinants in the bacterial phytopathogen *Erwinia*. **Meth. Microbiology**, v.29, p.347-426, 1999.

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

Toth, I. K.; Bell, K. S.; Holeva, M. C.; Birch, P. R. J. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. **Molecular Plant Pathology**, v.4, p.17–30, 2003.

Tung, S.Y.; Kuo, T. T. Requirement of phosphoglucose isomerase of *Xanthomonas campestris* in pathogenesis of citrus canker. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.5564-5570, 1999.

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.

Weels, J. M.; Raju, B. C.; Hung, H. Y.; Weinsberg, W. G.; Mandelco-Paul, L.; Brenner, D. J. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: Gram-negative, xylem-limited fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.2, p.136-143, 1987.

Wengelnik, K.; Bonas, U. HrpXv, an AraC-type regulator, activator expression of five of the six loci in the hrp cluster of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. **Journal Bacteriology**, v.178, p.3462-3469, 1996.

White, T. J.; Gonzalez, C. F. Electroporation of *Xanthomonas*. **Methods in Molecular Biology**, v.47, p.135-141, 1995.

Wood, P.J.; Erfle, J.D.; Teather, R.M. Use of complex formation between congo red and polysaccharide in detection and assay of polysaccharide hydrolases. **Methods in Enzymology**, v.160, p.59-74, 1988.

Wood, T. M.; Bhat, K. M. Methods for measuring cellulase activities. **Methods in Enzymology**, v.160, p.87-112, 1988.

Wulff, N. A. **Caracterização enzimática das celulasas Xf - 810, Xf - 818 e Xf - 2708 de *Xylella fastidiosa* e purificação da proteína Xf - 818, expressas em *Escherichia coli*.** 2002. 192p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - USP/ESALQ, Piracicaba, 2002.

Yang, B.; Zhu, W.; Johnson, L. B.; White, F. F. The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded DNA-binding protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.7, n.7, p.9807-9812, 2000.

Yang, Y.; Gabriel, D. W. *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.8, p.627–631, 1995a.

Yang, Y.; Gabriel, D. W. Intragenic recombination of a single plant pathogen gene provides a mechanism for the evolution of new host specificities. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.4963-4968, 1995b.

Young, L.; Dong, Q. TAMS technology for simple and efficient in vitro site-directed mutagenesis and mutant screening. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.3, p.11-13, 2003.

Zhou, S.; Davis, F. C.; Ingram, L. O. Gene integration and expression and extracellular secretion of *Erwinia chrysanthemi* endoglucanase CelY (*celY*) and CelZ (*celZ*) in ethanologenic *Klebsiella oxytoca* P2. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.1, p.6–14, 2001.

Zhou, S.; Ingram, L. O. Synergistic hydrolysis of carboxymethyl cellulose and acid-swollen cellulose by two endoglucanases (CelZ and CelY) from *Erwinia chrysanthemi*. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.20, p.5676-5682, 2000.

Zorreguieta, A.; Finnie, C.; Downie, J. A. Extracellular glycanases of *Rhizobium leguminosarum* are activated on the cell surface by an exopolysaccharide-related component. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.5, p.1304–1312, 2000.

APÊNDICE

Meio Ágar Nutriente – (sólido)

5,0g de Peptona

3,0g de Extrato de carne

1,0g de NaCl

18,0g de Ágar

1 L de H₂O Milli-Q qsp

Autoclavar

Meio “CMC” – (sólido)

5,0g de CMC

1,0g de NaNO₃

1,0g de K₂HPO₄

1,0g de KCl

0,5g de MgSO₄

0,5g de Extrato de levedura

1,0g de Glicose

17,0g de Ágar

1 L de H₂O Milli-Q qsp

Autoclavar

Meio NB – (líquido)

5,0g de Peptona

3,0g de Extrato de carne

2,0g de K₂HPO₄

0,5g de KH₂PO₄

1 L de H₂O Milli-Q qsp

Ajustar o pH para 7,2 e autoclavar.

Meio NBY – (sólido)

5,0g de Peptona

3,0g de Extrato de carne

2,0g de Extrato de levedura

2,0g de K_2HPO_4

0,5g de KH_2PO_4

15,0g de Ágar

1 L de H_2O Milli-Q qsp

Ajustar o pH para 7,2 e autoclavar.

Meio LB – (líquido)

10,0g de Triptona

5,0g de Extrato de levedura

10,0g de NaCl

1 L de H_2O Milli-Q qsp

Ajustar o pH para 7,0 e autoclavar (estoque 4 °C)

Meio XVM2 – (líquido)

1,16g de NaCl

1,32g de $(NH_4)_2SO_4$

1,23g de $Mg SO_4$

0,147g de $CaCl_2$

0,028g de KH_2PO_4

0,043g de K_2HPO_4

0,0027g de $FeSO_4$

1,8g de Frutose

3,42g de Sacarose

0,03% de Ácido de Casamino

1 L de H_2O Milli-Q qsp

Ajustar o pH para 6,7 e autoclavar (estoque 4 °C)

Meio SOC – (líquido)

Meio SOB

20,0g de Triptona

5,0g de Extrato de levedura

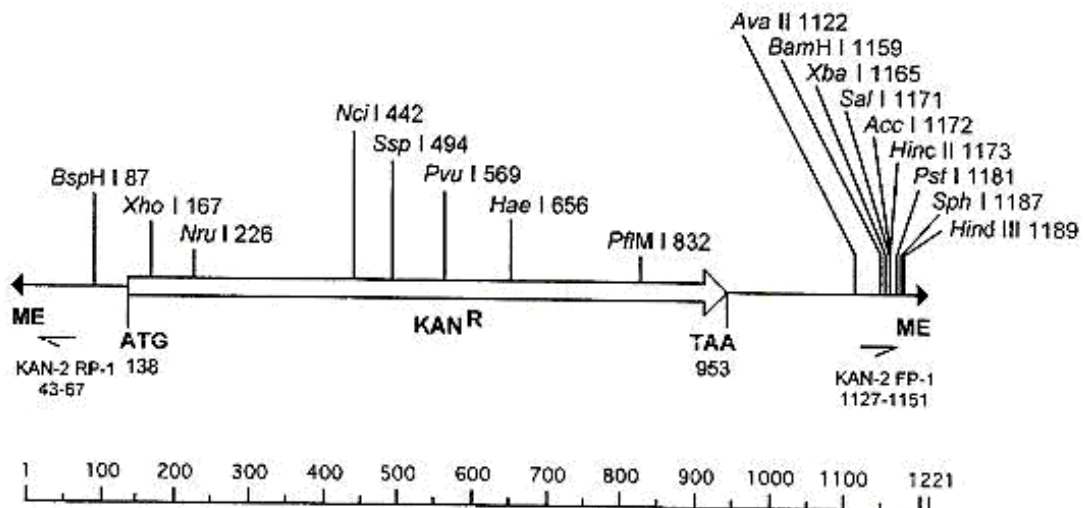
0,5g de NaCl

950mL H₂O Milli-Q

Adicionar a essa solução 10mL de KCl 250mM (1,86g de KCl em 100mL de H₂O), ajustar o pH para 7,0; completar para 1L e autoclavar. Pouco antes de usar, adicionar 5 mL de MgCl₂ 2M (19g de MgCl₂ em 90mL de H₂O; ajustar para 100mL e autoclavar). Deixar o SOB esfriar e adicionar 20 mL de solução 1M de glicose estéril (18g em 90mL de H₂O destilada, ajustar para 100mL, esterilização por filtração).

ANEXOS

EZ::TN™ <KAN-2> Transposon
(1221 bp.)



Note: Not all restriction enzymes that cut only once are indicated above.
See the following pages for further information.
Primers are not drawn to scale.

Figura 1A. Representação esquemática do cassete de marca de seleção do *transposon* EZ::TN <KAN-2> presente no complexo que compreende também associação com a enzima “EZ::TN transposase” (Epicentre Technologies, Madison, Wis.).

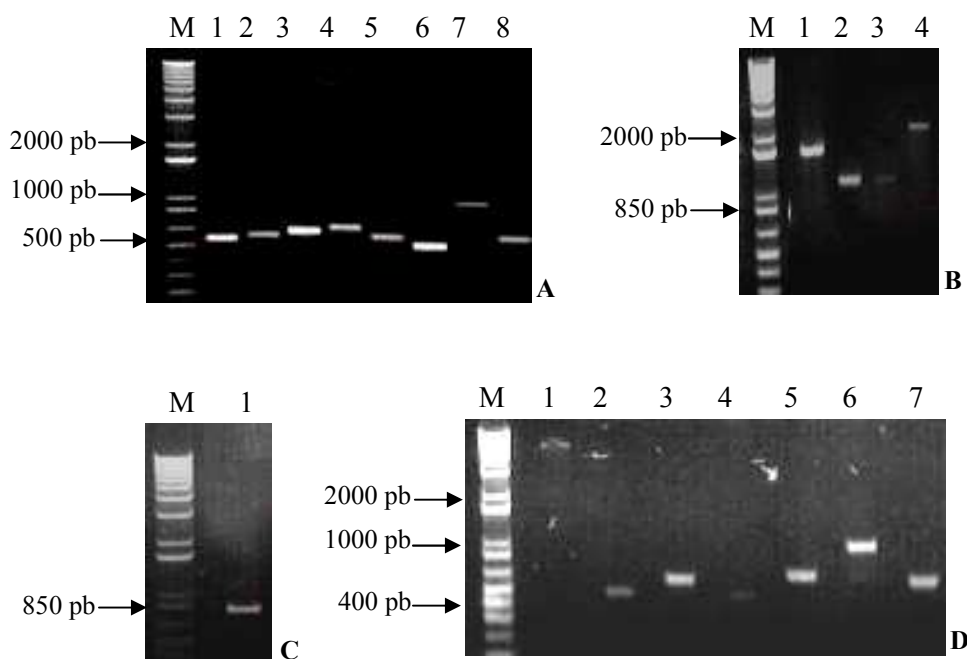


Figura 2A. Gel de agarose a 0,8% com os fragmentos amplificados de ORFs anotadas como para “degradação de parede celular”. **A.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: XAC0028; 2: XAC0029; 3: XAC0030; 4: XAC0168; 5: XAC2986; 6: XAC3076; 7: XAC3516; 8: XAC3562; **B.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: XAC0612; 2 e 3: XAC0661; 4: XAC2522; **C.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: XAC4231; **D.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: DNA de lambda (10 ng); 2: XAC0143; 3: XAC0346; 4: XAC1770; 5: XAC1793; 6: XAC2373; 7: XAC3076.

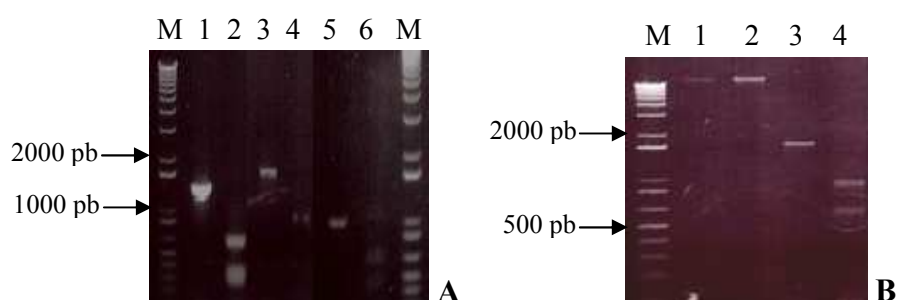


Figura 3A. Gel de agarose (0,8%) com os fragmentos (amplificados/digeridos) de ORFs anotadas como para “degradação de parede celular”. **A.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: *amplicon* de XAC0612; 2: *amplicon* de XAC0612 digerido com *EcoRI*; 3: *amplicon* de XAC2522; 4: *amplicon* de XAC2522 digerido com *PstI*; 5: *amplicon* de XAC3516; 6: *amplicon* de XAC3516 digerido com *SalI*; M: Marcador 1 Kb Plus DNA; **B.**

B. M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: DNA de lambda (10ng); 2: DNA de lambda (50ng); 3: *amplicon* de XAC2374; 4: *amplicon* de XAC2374 digerido com *Sma*I.

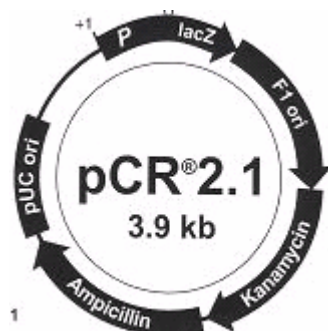


Figura 4A. Mapa do plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO.



Figura 5A. Gel de agarose (0,8%) da minipreparação de DNA dos fragmentos sub-clonados no plasmídeo pCR[®]2.1-TOPO de ORFs anotadas como para “degradação de parede celular”. M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: DNA de lambda (10ng); 2: XAC0028; 3: XAC0029; 4: XAC0030; 5: XAC0143; 6: XAC0168; 7: XAC0346; 8: XAC0661; 9: XAC1770; 10: XAC1793; 11: XAC2373; 12: XAC2986; 13: XAC3076; 14: XAC3562; 15: XAC4231.

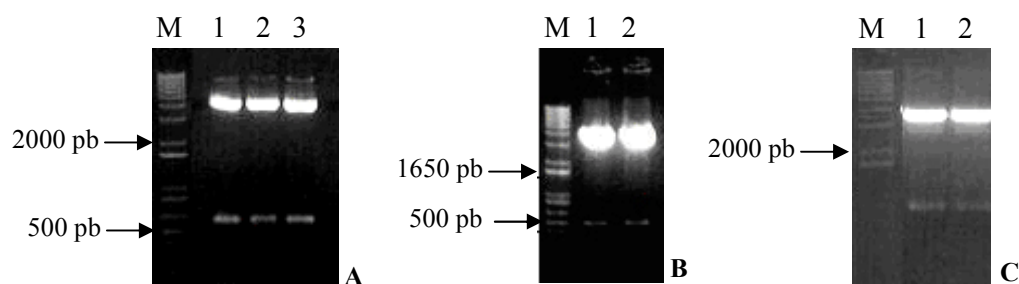


Figura 6A. Gel de agarose (0,8%) com amostras de minipreparação de alguns dos fragmentos sub-clonados no plasmídeo pCR[®] 2.1-TOPO clivados com a endonuclease de restrição *EcoRI*. **A.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1, 2 e 3: 10 μ L 0030; **B.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1 e 2: 10 μ L XAC1770; **C.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1 e 2: 10 μ L XAC4231.

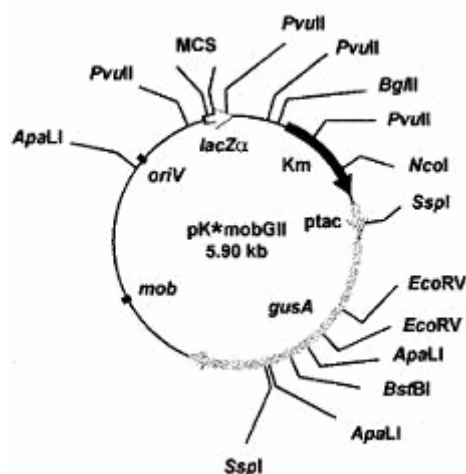


Figura 7A. Mapa físico dos vetores pK*mobGII. O asterisco simboliza que tal construção representa tanto o plasmídeo 18 quanto o 19.

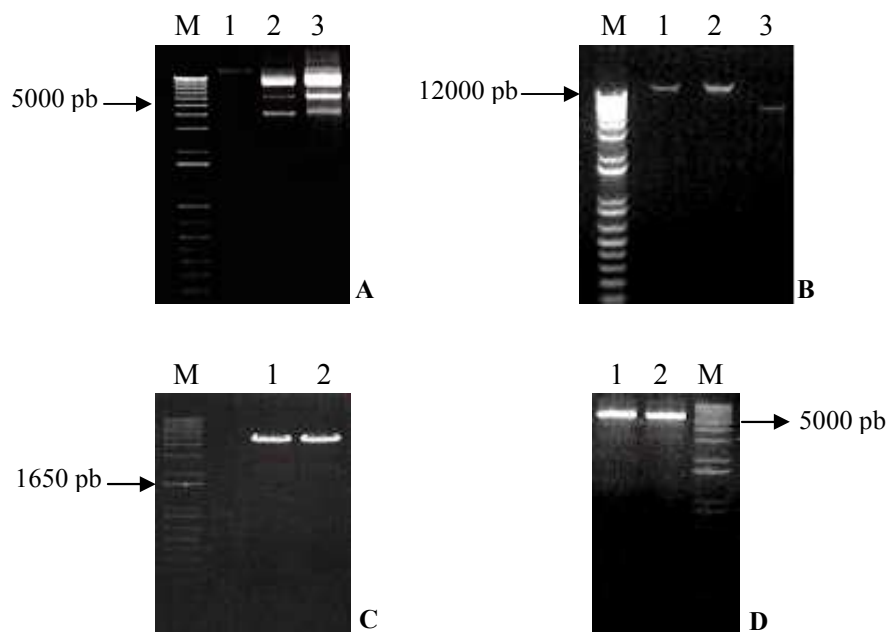


Figura 8A. Gel de agarose (0,8%) com DNA do plasmídeo pk18*mob*GUSII. **A.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: DNA de lambda (10ng); 2 e 3: DNA plasmidial. **B.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: DNA de lambda (5ng); 2: DNA de lambda (10ng); 3: DNA plasmidial purificado, quantificado e clivado pela enzima de restrição *Eco*RI; **C.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1: DNA plasmidial purificado, quantificado e clivado pela enzima de restrição *Pst*I; 2: DNA plasmidial purificado, quantificado e clivado pela enzima de restrição *Sal*I; **D.** M: Marcador de DNA 1 Kb Plus; 1 e 2: DNA plasmidial purificado, quantificado e clivado pela enzima de restrição *Sma*I.

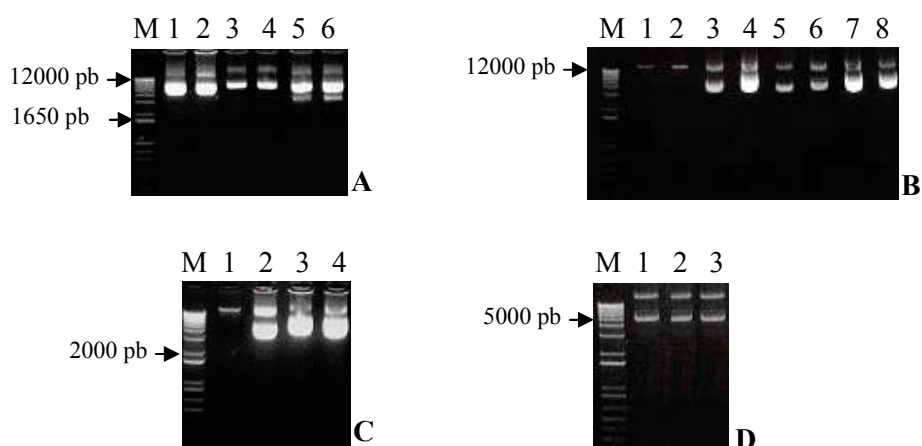


Figura 9A. Gel de agarose (0,8%) do minipreparação de DNA dos fragmentos clonados no plasmídeo pk18*mob*GUSII. **A.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: XAC0030, 2: XAC0143, 3: XAC2373, 4: XAC2522, 5: XAC1770, 6: XAC3076; **B.** M: Marcador 1

Kb Plus DNA, 1: DNA de lambda (10ng); 2: DNA de lambda (50ng); 3: XAC0028, 4: XAC0029, 5: XAC0168, 6: XAC0661, 7: XAC1793, 8: XAC2374; **C.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: DNA de lambda (50ng), 2: XAC3516, 3: XAC3562, 4: XAC4231; **D.** M: Marcador 1 Kb Plus DNA; 1: XAC0346; 2: XAC0612; 3: XAC2986.