



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DA LIPASE/ESTERASE  
LesA SECRETADA POR *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* NA DOENÇA DO  
CANCRO CÍTRICO.**

**Discente: Lorraine Cristina Polloni**

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Nascimento**

**Uberlândia-MG**

**2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DA LIPASE/ESTERASE  
LesA SECRETADA POR *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* NA DOENÇA DO  
CANCRO CÍTRICO.**

**Discente: Lorraine Cristina Polloni**

**Orientador: Prof. Dr. Rafael Nascimento**

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção  
do Título de Mestre em  
Genética e Bioquímica.**

**Uberlândia-MG**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

P777c Polloni, Lorraine Cristina, 1991  
2016 Caracterização bioquímica e funcional da lipase/esterase lesA secretada por *Xanthomonas axonopodis* pv. citri na doença do cancro cítrico. / Lorraine Cristina Polloni. - 2016.  
72 f. : il.

Orientador: Rafael Nascimento.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. *Xanthomonas axonopodis* - Teses. 3. Lipase - Teses. 4. Esterases - Teses. I. Nascimento, Rafael, 1983-. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DA LIPASE/ESTERASE  
LesA SECRETADA POR *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* NA DOENÇA DO  
CANCRO CÍTRICO.**

**Discente:** Lorraine Cristina Polloni

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Rafael Nascimento

**Examinadores:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Data da defesa:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas

---

Prof. Dr. Rafael Nascimento

“É melhor ser sábio que ser forte, e o conhecimento vale mais que a força. É com estratagemas que se faz a guerra, e a vitória depende do número de conselheiros.”

Provérbios 24:5,6.

## **Agradecimentos**

Ao meu bom Deus, por ser misericordioso comigo e jamais ter me abandonado.

Obrigada meu Deus pela força que o Senhor me proporcionou e pela graças alcançadas.

Aos meus pais Aparecida Genoveva Silingardi Polloni e Luiz Sergio Polloni, meus anjos, minha vida, meus heróis. Agradeço imensamente todo amor e dedicação que tem para comigo, pois sem vocês eu não chegaria até aqui, pois vocês são minha inspiração.

Aos meus Irmãos Lorena Polloni e Luiz Paulo Polloni, pelo carinho e empenho em me ajudar nas horas difíceis. Vocês são os melhores amigos que eu poderia ter, vocês alegram o meu viver, obrigada por existirem.

Ao amor de minha vida, melhor amigo e companheiro de todas as horas, Heber Leão Silva Barros, pelo carinho, compreensão e amor inefável. Por sempre corrigir meus trabalhos, me ensinar que a vida vale mais a pena ser vivida se aproveitarmos cada minuto e por sempre me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao meu orientador, prof. Dr. Rafael Nascimento e a Dra. Hebréia Oliveira Almeida, pela oportunidade concedida, confiança depositada, ensinamentos transmitidos, pelo acompanhamento e orientação durante todo o trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelosuporte e apoio financeiro.

Aos membros da Banca Examinadora, que gentilmente aceitaram o convite para avaliarem este trabalho.

A equipe *Plant team* e os colegas Nanos pela amizade e ajuda nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, por permitir que os experimentos fossem realizados no laboratório de Nanobiotecnologia.

À família Barros, Harley, Helenilda, Hugo e Vó Nilda, pelo carinho e amizade.

## Resumo

A proteína LesA é uma enzima do tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase codificada pelo gene XAC0501 em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), agente causador do cancro cítrico. Análises *in silico* revelaram que o gene *lesA* codifica uma lipase/esterase ortóloga à enzima LipA, presente em diversas espécies do grupo das *Xanthomonas*. Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização bioquímica da proteína LesA e determinar a sua importância na virulência de Xac. Para isso, mutantes de Xac para o gene *lesA* ( $\Delta$ Xac-LesA), foram obtidos e submetidos a caracterização de sua atividade lipásica e esterásica, onde apresentou significativa redução em comparação com a cepa selvagem Xac str. 306 (Xac306<sub>wt</sub>). Com a finalidade de se constatar a importância da LesA na virulência e patogenicidade do microrganismo em estudo, folhas de citros foram inoculadas com  $\Delta$ Xac-LesA e Xac306<sub>wt</sub>. Os resultados demonstram que os mutantes foram capazes de causar danos teciduais, porém, em menor escala que a Xac306<sub>wt</sub>, possivelmente devido a ausência da atividade de LesA. Provavelmente, esta deficiência na patogênese de  $\Delta$ Xac-LesA pode ter sido causada pela ausência da expressão da LesA. Em seguida, se procedeu com as análises dos secretomas *in planta* (folhas de citros infectada com Xac306<sub>wt</sub>) e das três condições de meio de cultivo diferentes (meio que não induz a virulência, NB, e dois meios indutores de virulência XAM1 e XAM1-Ex), a fim de identificar a LesA. Infelizmente, não constatamos a presença da LesA nos secretomas, contudo os dados encontrados oferecem novos *insights* sobre como ocorre a patogênese deste microrganismo e permitiu a identificação de uma série de fatores de virulência que podem ser importantes no desenvolvimento da doença. Posteriormente, se procedeu com a caracterização bioquímica das colônias de Xac306<sub>wt</sub> sob diferentes condições de cultivo *in vitro*, e observamos que a atividade lipásica foi maior nas colônias cultivadas em XAM1 e XAM1-Ex do que em NB. No entanto, a atividade esterásica não demonstrou o mesmo resultado. A partir da expressão de proteína LesA em *E. coli* DH5a, se confirmou a atividade de lipase/esterase desta enzima que provou ser capaz de ativar uma resposta de hipersensibilidade em *Nicotiana tabacum*. Em conclusão, propomos que LesA desempenha um papel importante na virulência do patógeno Xac, oferecendo novos *insights* sobre a patogênese deste microrganismo.

Palavras-chave: atividade lipásica, atividade esterásica, secretoma, LesA, resposta de hipersensibilidade.

## Abstract

LesA, from the citrus canker pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), is an  $\alpha/\beta$  hydrolase fold protein with lipase/esterase function encoded by the gene XAC0501. *In silico* analysis revealed that LesA gene encodes a lipase/esterase orthologous to the LipA enzyme, which is present in several species of *Xanthomonas*. In this study, we aimed to biochemically characterize LesA, and to determine the importance of this protein in the virulence of Xac. A LesA mutant was generated, and lipase and esterase activities showed that it was significantly diminished in the *lesA* mutant compared with wild-type str. 306 (Xac306<sub>wt</sub>). If LesA is partially responsible for citrus canker symptoms, there should be spatial association of LesA with the leaf symptom. As a demonstration of the ability of LesA to induce symptoms,  $\Delta$ Xac-LesA and Xac306<sub>wt</sub> cells were pressure-infiltrated into citrus leaves. The mutants were able to induce local necrosis, but not as much as the Xac306<sub>wt</sub>. The  $\Delta$ Xac-LesA mutants may be deficient in pathogenesis due to the lack of LesA. Furthermore, with the aim of confirming the importance of the LesA protein on the virulence of Xac, we proceeded with a secretome analysis *in planta* (citrus leaf infected with Xac306<sub>wt</sub>) as well as under three different *in vitro* growth conditions. For the cultivation of bacteria, we used a virulence non-inductive medium, NB, and two virulence-inductive media XAM1 and XAM1-Ex (XAM1 plus 30% of citrus leaf extract). Unfortunately, we could not identify the presence of the lipase/esterase LesA from the secretomes. The secretome analysis presented here offers, nonetheless, new insights into the pathobiology of this pathogen. This secretome enabled us to identify a series of putative virulence factors that might play important roles in the development of citrus canker. We proceeded with the biochemical characterization of Xac306<sub>wt</sub> grown under different *in vitro* conditions. Results showed that the lipase activity was higher in the cells grown under virulence-inductive medium than the non-inductive medium. Nevertheless, the esterase activity did not demonstrate the same result. We performed the recombinant expression of LesA protein in *E. coli* cells. The results confirmed the lipase/esterase activity of this enzyme. In addition, LesA was able to activate a hypersensitive response in *Nicotiana tabacum*. In conclusion, we propose that LesA may play an important role in the virulence of Xac.



Key-words: Lipase activity, esterase activity, secretome, LesA, hypersensitive response.

## Lista de figuras e tabelas

Figura 1. Sintomas causados pela <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> na doença do cancro cítrico .....	12
Figura 2. O minador-das-folhas-dos-citros .....	13
Figura 3. Análise filogenética das sequências homólogas a LipA .....	20
Figura 4. Confirmação da interrupção do gene <i>lesA</i> em Xac306 através da amplificação por PCR .....	35
Figura 5. Folha de <i>Citrus sinensis</i> infectada com <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 e o seu mutante para o gene <i>lesA</i> .....	36
Figura 6. Caracterização das atividades lipásica e esterásica dos mutantes de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 para o gene <i>lesA</i> .....	37
Figura 7. Folhas de <i>Citrus sinensis</i> infectadas com <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 e SDS-PAGE das proteínas extraídas .....	38
Figura 8. Atividade lipásica de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 cultivado sob condições diferentes <i>in vitro</i> .....	41
Figura 9. Atividade esterásica comparativa das proteínas secretadas por colônias de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 cultivadas em três condições diferentes de meio de cultura .....	42
Figura 10. Distribuição das proteínas secretadas por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 identificadas por LC-MSMS nas três condições de cultivo <i>in vitro</i> .....	47
Figura 11. Detecção da proteína LesA recombinante por <i>Western blotting</i> .....	48
Figura 12. <i>Escherichia coli</i> cepa DH5 $\alpha$ expressando o gene <i>lesA</i> de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> .....	49
Figura 13. Resposta de hipersensibilidade em folhas de <i>Nicotiana tabacum</i> .....	50
Tabela 1. Proteínas secretadas <i>in planta</i> por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 em citros identificadas por espectrometria de massas .....	39
Tabela 2. Proteínas secretadas por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306 em três condições de cultivo identificadas por LC-MSMS .....	43

## Sumário

1. Introdução.....	10
1.1. Cancro cítrico .....	11
1.2. Agente etiológico .....	13
1.3. Os genomas.....	14
1.4. Os proteomas .....	15
1.5. Rotas de secreção.....	16
1.6. Lipases extracelulares .....	17
1.7. Proteína LesA .....	19
2. Objetivos .....	22
2.1. Objetivo geral .....	22
2.2. Objetivos específicos .....	22
3. Material e métodos .....	23
3.1. Linhagem bacteriana, manutenção e condições de cultivo. ....	23
3.2. Obtenção do mutante de Xac306 ( $\Delta$ Xac-LesA) para caracterizar a virulência e patogenicidade <i>in planta</i> . ....	23
3.2.1. Construção e síntese do vetor plasmidial para a obtenção do mutante $\Delta$ Xac-LesA. ....	23
3.2.2. Preparação de células competentes e eletroporação de Xac306 <sub>wt</sub> para a obtenção dos mutantes. ....	24
3.2.3. Caracterização molecular do mutante $\Delta$ Xac-LesA. ....	24
3.2.4. Teste de virulência e patogenicidade <i>in planta</i> .....	25
3.3. Determinar o secretoma por espectrometria de massa (LC-MSMS) da Xac306 <sub>wt</sub> <i>in planta</i> . ....	26
3.3.1. Inoculação de Xac306 <sub>wt</sub> em folhas de citros. ....	26
3.3.2. Extração das proteínas totais de folhas de citros inoculadas com Xac306 <sub>wt</sub> .....	26
3.3.3. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). ....	27
3.3.4. Tripsinização e análise por espectrometria de massa. ....	27
3.4. Determinar o secretoma por LC-MSMS de Xac306 <sub>wt</sub> em três condições diferentes de meio de cultura.....	28
3.4.1. Preparo do extrato aquoso foliar de citros.....	28
3.4.2. Cultivo de Xac306 <sub>wt</sub> em meios de cultura indutivos XAM1 e XAM1-Ex e em meio NB.....	29
3.4.3. Extração de proteína pelo método TCA/Acetona.....	29
3.4.4. Análise do perfil proteico por SDS-PAGE e LC-MSMS.....	30

3.5. Expressão da proteína LesA recombinante em células <i>E. coli</i> cepa e teste de hipersensibilidade <i>in planta</i> .	30
3.5.1. Construção e síntese do vetor plasmidial para a obtenção da proteína recombinante LesA.	30
3.5.2. Preparação de células competentes e eletroporação de <i>E. coli</i> cepa DH5 $\alpha$ .	30
3.5.3. Expressão heteróloga da proteína recombinante de Xac (LesA).	31
3.5.4. Extração da proteína recombinante e confirmação por <i>Western blotting</i> .	31
3.5.5. Ensaio de hipersensibilidade em folhas <i>Nicotiana tabacum</i> .	32
3.6. Caracterização bioquímica das atividades lipásica e esterásica.	33
3.6.1. Atividade lipásica das colônias Xac <sub>wt</sub> , $\Delta$ Xac e DH5 $\alpha$ -LesA.	33
3.6.2. Atividade lipásica do sobrenadante e do lisado de DH5 $\alpha$ -LesA.	33
3.6.3. Ensaio da atividade esterásica.	34
4. Resultados	35
4.1. Caracterização molecular, da virulência e patogenicidade dos mutantes $\Delta$ Xac-LesA <i>in planta</i> .	35
4.2. Caracterização bioquímica da atividade lipásica e esterásica dos mutantes.	36
4.3. Caracterização proteômica das proteínas secretadas por Xac306 <sub>wt</sub> <i>in planta</i> .	37
4.4. Determinação do secretoma <i>in vitro</i> por LC-MSMS e caracterização bioquímica de Xac306 <sub>wt</sub> em três condições diferentes de cultivo.	41
4.5. Expressão da proteína LesA recombinante em células de <i>E. coli</i> , purificação e caracterização bioquímica da atividade lipásica e esterásica.	48
4.6. Ensaio de hipersensibilidade <i>in planta</i> .	50
5. Discussão	51
6. Conclusões	61
7. Referências	62

## 1. Introdução

A citricultura é um ramo da fruticultura presente em praticamente todos os países tropicais e subtropicais do mundo (NOCE & MOTA, 2004). Os principais produtores mundiais de citros são encontrados nas Américas, no Mediterrâneo, no Sul e no Leste Asiático, sendo que entre todos países produtores de citros, o Brasil lidera na produção e exportação mundial, tanto de frutas frescas como de suco concentrado (TALON & GMITTER, 2008). A área plantada de citros no Brasil é a segunda maior em relação às outras frutas (7,6 milhões de hectares), perdendo apenas para a produção de banana (10,2 milhões de hectares). Dentre as frutas cítricas encontradas em solo brasileiro, a área cultivada com laranja representa cerca de 55%, o que consolida essa cultura como a principal no país (NEVES *et al.*, 2010). A produção citrícola brasileira está concentrada nas regiões Sudeste (principalmente no estado de São Paulo e no Triângulo Mineiro) e no Nordeste (Bahia e Sergipe), embora a cultura esteja presente em todas as regiões brasileiras (IBGE, 2016).

Apesar da competitividade que o setor citrícola brasileiro exerce, arrecadando US\$ 189 milhões em impostos para o Estado brasileiro, a sua produtividade é considerada baixa, apresentando aproximadamente 556 caixas/ha, comparado à produção dos Estados Unidos que é aproximadamente de 705 caixas/ha (NEVES *et al.*, 2010; FAO, 2012). Vários fatores estão associados a essa baixa produtividade, dentre estes se destacam o aumento de pragas e doenças somado ao custo de produção.

Pragas e doenças foram responsáveis pela erradicação de 40 milhões de árvores nesta última década e a mortalidade saltou de 4% para preocupantes 7,5%, ocasionando aumento de custo de produção e, conseqüentemente, a descapitalização do citricultor, sendo responsável pelo êxodo das culturas. Essas doenças foram responsáveis por perdas de quase 80 milhões de caixas por ano (NEVES *et al.*, 2010; BAPTISTELLA *et al.*, 2012). Dentre os problemas fitossanitários, o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac), é uma doença grave devido às suas características fitopatológicas e por não existir métodos de controle totalmente eficientes (GOTTWALD *et al.*, 2001).

### 1.1. Cancro cítrico

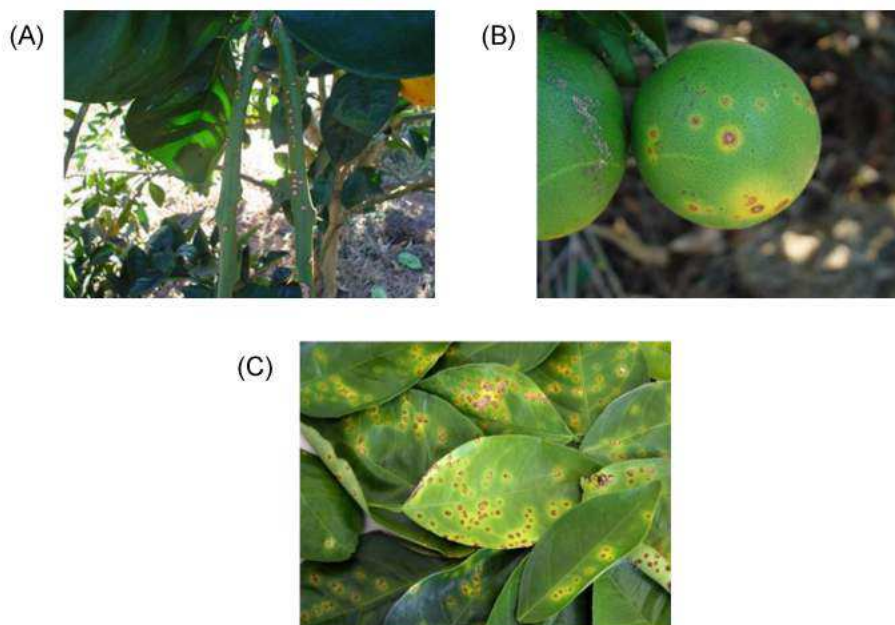
Em todo mundo o cancro cítrico é considerado como uma das mais importantes doenças dentre aquelas que ocorrem na cultura do citros, pelo fato de não existirem métodos de controle curativos (LEITE JÚNIOR, 1990; GOTTWALD *et al.*, 2001; AMARAL, 2003). Esta fitopatologia é causada por um organismo bastante agressivo e de rápida disseminação, que tem como provável origem o sudeste asiático. Vários países classificam a doença como “Praga Exótica”, fazendo com que as importações sejam realizadas mediante uma série de exigências (AMARAL, 2003).

Desde a 11ª Reunião do Grupo de Trabalho Permanente em Quarentena Vegetal (Montevidéu, Uruguai, junho de 1995), o Brasil classifica o cancro cítrico como “Praga Quarentenária A2” (RODRIGUES NETO & RIBEIRO, 2002), ou seja, o cancro cítrico está presente no país ou região, porém está limitada a uma determinada área oficialmente controlada (AMARAL, 2003). A doença foi constatada pela primeira vez em solo brasileiro na década de 50, no município de Presidente Prudente localizado no interior do estado de São Paulo, através de mudas japonesas de citros infectados que entraram ilegalmente no país (BITANCOURT, 1957; HASSE, 1987).

Em meados de 2009, o cancro cítrico voltou a ser uma grande preocupação no setor citrícola brasileiro, principalmente no estado de São Paulo, pois a legislação do Programa de Erradicação do Cancro Cítrico foi amenizada, excluindo a exigência de erradicação de todo o talhão de plantas em situações que o índice de contaminação fosse 0,5% ou mais. A doença se manteve com baixas incidências de talhões contaminados entre os anos de 2001 e 2009, variando entre 0,08% e 0,2%. Porém, a partir de 2010, começou a avançar e chegou a 0,44% de talhões contaminados, sendo que, em 2012 registrou o maior índice de incidência da doença desde seu primeiro relato em solo brasileiro no ano de 1957, atingindo 1,39% de talhões contaminados (ASSOCITRUS, 2015).

Nesta doença todos os órgãos da planta situados acima do solo podem ser afetados (Figura 1). Os locais que mais apresentam sintomas nos citros são as folhas e os frutos que podem apresentar lesões circulares, corticosas, eruptivas, de coloração parda e circundadas por um halo amarelo (KOLLER *et al.*, 1993; SPANN *et al.*, 2007). Em estágio avançado o cancro cítrico é capaz de causar

desfolha intensa, depreciação e queda de frutos. Um sintoma característico desta fitopatologia é a indução da formação de tecido hiperplásico, causado por divisões mitóticas excessivas que resulta em lesões do tipo cancro (BRUNINGS & GABRIEL, 2003).



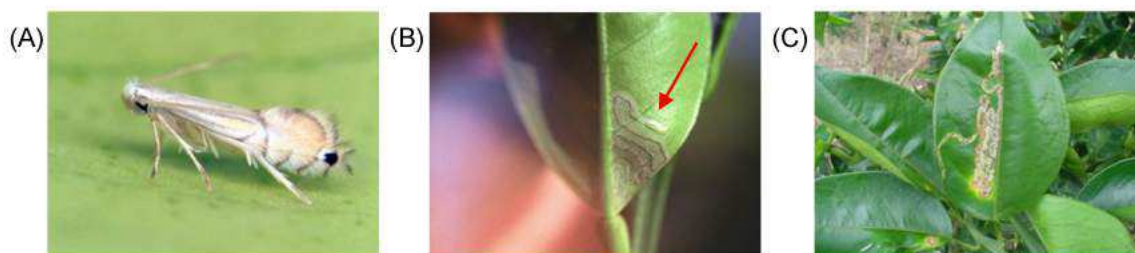
**Figura 1. Sintomas causados pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* na doença do cancro cítrico.** Lesões provocadas pelo cancro cítrico em (A) ramos, (B) frutos e (C) folhas de laranja doce.

Fonte: Adaptado de <<http://www.fundecitrus.com.br/doencas/cancro/7>>.

O ciclo do cancro cítrico geralmente ocorre a partir de lesões ativas da doença localizadas em folhas e ramos remanescentes na planta. As células bacterianas presentes nessas lesões são disseminadas principalmente através da chuva, que pode estar ou não associada ao vento, para as plantas mais próximas (STALL & SEYMOUR, 1983; GOTTWALD & TIMMER, 1995). Além da disseminação por meio de aerossóis, durante a ocorrência simultânea de chuva e vento, o patógeno causador da doença pode ser dispersado a outros locais por meio de materiais vegetais infectados, como frutos e mudas, assim como por meio de ferramentas e materiais de colheita, implementos e veículos contaminados que transitam pelos pomares (LEITE JÚNIOR, 1990).



Outro fator que favorece a contaminação de pomares pela bactéria do cancro cítrico, é a presença da mariposa *Phyllocnistis citrella*, conhecida popularmente como minador-das-folhas-dos-citros (Figura 2). A larva desta mariposa provoca ferimentos na planta, principalmente nas brotações, que servem de porta de entrada para a bactéria do cancro cítrico.



**Figura 2. O minador-das-folhas-dos-citros.** (A) Adulto do minador-das-folhas-dos-citros, (B) larva-minadora-dos-citros e (C) Galerias em folhas de citros formadas pelo minador e consequente redução da área foliar. Fonte: Adaptado de <http://www.fundecitrus.com.br/doencas/minador/8>

Devido às perdas econômicas causados pelo cancro cítrico, um consórcio brasileiro denominado ONSA (*Organization to the Nucleotide Sequencing and Analysis*), da FAPESP, se propôs a sequenciar o genoma da bactéria causadora da doença (DA SILVA *et al.*, 2002). Este sequenciamento permitiu que surgissem novas perspectivas para a caracterização genética e funcional de genes relacionados à virulência e ao metabolismo primário.

### **Agente etiológico**

O gênero *Xanthomonas* constitui um dos gêneros mais dispersos na natureza, com capacidade de infectar cerca de 390 espécies botânicas, sendo 120 monocotiledôneas e 270 dicotiledôneas (LEYNS *et al.*, 1984). De acordo com a classificação filogenética, o gênero *Xanthomonas* pertence ao filo Proteobacteria, classe “Gammaproteobacteria” (Classe III), ordem “Xanthomonadales” (Ordem II), e família “Xanthomonadaceae” (GARRITY & HOLT, 2000). Este gênero apresenta como características bactérias com formato baciloformes, Gram-negativas, estritamente aeróbicas que possuem um único flagelo polar, e formam colônias



amarelas em meio ágar nutriente devido à produção do pigmento xantomonadina (BRADBURY, 1993; BEDENDO, 1995).

Seis espécies de bactérias do gênero *Xanthomonas* são identificadas como agentes causadores de doenças em cítricos. Dentre essas doenças, a mais importante e severa é o cancro cítrico, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *citri*, antigamente denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Xac (VERNIÈRE *et al.*, 1998). A patogenicidade desta bactéria, assim como nas demais bactérias Gram-negativas, está intimamente relacionada à sua capacidade de colonização no hospedeiro somada à produção e secreção de enzimas e proteínas que degradam constituintes da parede celular do hospedeiro, das quais irá facilitar a penetração do microrganismo nas células causando danos à planta.

Apesar dos esforços da planta hospedeira em combater a infecção causada pelo patógeno, as enzimas de degradação secretadas quando trabalham em conjunto com outros fatores como os diversos sistemas de secreção de toxinas e proteínas presentes no patógeno, enzimas com capacidade de neutralizar as espécies reativas de oxigênio geradas pela planta hospedeira, e estruturas de adesão bacteriana, são capazes de desenvolver a patogênese (BUTTNER & BONAS, 2002; KAZEMI-POUR *et al.*, 2004).

No início do século XXI, Da Silva e colaboradores (2002) sequenciaram o genoma completo da Xac e, a partir de então, a genômica funcional tornou-se uma poderosa ferramenta para o estudo deste fitopatógeno, auxiliando na identificação de genes responsáveis pela indução de sintomas do cancro em hospedeiros cítricos.

### **Os genomas**

Desde o início do século XXI, várias sequências genômicas completas de fitobactérias foram determinadas, tais como as da *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* e a Xac (SIMPSON *et al.*, 2000; SALANOUBAT *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 2002; BUELL *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2005; THIEME *et al.*, 2005). O sequenciamento

genômico de fitopatógenos se tornou uma importante ferramenta deste século para a compreensão da especificidade dessas bactérias aos seus respectivos hospedeiros e das diferenças em seus processos de patogenicidade e virulência, visto que possibilita a caracterização dos padrões de expressão e regulação das proteínas envolvidas (SWEIGARD & EBBOLE, 2001; CHO *et al.*, 2006).

O sequenciamento do genoma da Xac possibilitou sua caracterização estrutural e a identificação de três estruturas distintas: um cromossomo com 5.175.554 pares de bases (pb), onde 4.374 sequencias codificantes (ORFs, de *open reading frames*) foram identificadas e anotadas; um plasmídeo (pXAC64) com 64.920 pb e 73 ORFs e um outro plasmídeo (pXAC33) com 33.699 pb e 42 ORFs (RODRIGUES NETO & RIBEIRO, 2002). As identificações de regiões codificadoras no genoma somaram um total de 4.489 ORFs, das quais 2.770 (61,71%) apresentam funções associadas a proteínas com funções conhecidas descritas na literatura e 1.658 (36,93%) correspondem a proteínas sem função descrita até o momento da conclusão do genoma (DA SILVA *et al.*, 2002).

Embora a sequência do genoma desse fitopatógeno tenha sido revelada, informações a respeito da expressão e secreção de proteínas de Xac em condições *in vitro* ou *in planta* permanecem escassas. Para a investigação da expressão e secreção das proteínas, a proteômica, uma técnica que foi bastante aprimorada nos últimos tempos, vem sendo muito utilizada nesses estudos.

### **Os proteomas**

Introduzido em 1995, o termo proteômica representa uma das áreas centrais da genômica funcional e se refere à caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expressas em uma célula ou tecido em determinada situação (WILKINS *et al.*, 1997). Sendo assim, o proteoma se torna uma importante ferramenta na fitopatologia, pois possibilita a aquisição em larga escala de informações sobre os grupos proteicos envolvidas diretamente com diferentes situações metabólicas e fisiológicas de um dado microrganismo (ANDERSON & SEILHAMER, 1997). Porém, a análise das proteínas presentes no interior da bactéria não abrange aquelas secretadas pelo patógeno quando interage com o hospedeiro.

As proteínas secretadas por bactérias patogênicas desempenham um papel crítico na virulência do organismo, tais como provisão de nutrientes, comunicação célula-célula, desintoxicação do meio e inibição de potenciais competidores (JUNGBLUT *et al.*, 1999; LEI *et al.*, 2000; ROSENKRANDS *et al.*, 2000; GHOSH, 2004; GOTTIG *et al.*, 2009). Portanto, essas proteínas secretadas permitem que o microrganismo interaja com o ambiente externo e influencie de modo favorável a ele, modulando um ambiente que muitas vezes se encontra inacessível devido à impossibilidade de locomoção ou restrições de crescimento impostas pelo ambiente (ANTELMANN *et al.*, 2001).

A estratégia utilizada para a detecção das proteínas secretadas por células em regiões extracelulares é o secretoma (GREENBAUM *et al.*, 2001). O secretoma representa cerca de 30% do proteoma de um organismo (RANGANATHAN *et al.*, 2009). Essa caracterização das proteínas secretadas auxilia na compreensão dos mecanismos responsáveis pela plasticidade do secretoma e suas aplicações, em direção a um melhor controle das doenças e compreensão dos papéis biológicos dos agentes patogênicos (GIRARD *et al.*, 2013).

### **Rotas de secreção**

O transporte ativo de proteínas através da membrana citoplasmática bacteriana é denominado de secreção. As bactérias secretam proteínas por meio de diversos sistemas especializados de secreção. Até o momento, seis sistemas de secreção de proteínas foram identificados em microrganismos: tipo I, II, III, IV, V e VI (THANASSI & HULTGREN, 2000).

Na secreção por meio dos sistemas do tipo I, III e IV, os próprios constituintes do complexo de secreção encaminham as proteínas para o meio externo, ou seja, o material é transportado diretamente ao espaço externo ou inserido na célula hospedeira. Os sistemas de secreção dos tipos II e V funcionam por um mecanismo de duas etapas, no qual proteínas são transladadas ao espaço periplásmico através da membrana interna, devido ao reconhecimento de um peptídeo de sinalização localizado na porção N-terminal da proteína, e então enviadas ao espaço extracelular pela membrana externa (ENDERSON *et al.*, 2004; KOROTKOV *et al.*, 2012). Um protótipo do sistema de secreção tipo VI tem

sido descrito para translocação extracelular de sequências de proteínas hidrofóbicas sem o N-terminal (PUKATZKI *et al.*, 2006).

O sistema de secreção do tipo II está intimamente relacionado à virulência de diversas fitobactérias, incluindo as do gênero *Xanthomonas*, pois está envolvido na secreção de enzimas extracelulares necessárias à hidrólise de componentes da parede celular vegetal. Dentre as classes de proteínas secretadas pelo sistema de secreção do tipo II, destacam-se as enzimas degradantes da parede celular vegetal, tais como as celulases, xilanases, pectinases, proteases e lipases (JHA *et al.*, 2005). Essas enzimas, apesar de não serem fundamentais para o desenvolvimento da doença, apresentam um papel importante na patogênese, de modo que os mutantes que tiverem interrompida a expressão destes, irão apresentar sintomas atenuados de cancrose quando comparados à bactéria selvagem (BAPTISTA, 2006).

Dentre as enzimas amplamente secretadas por este sistema, as lipases extracelulares, já foram descritas na literatura como um mecanismo essencial à patogênese e/ou virulência em vários microrganismos pertencentes à ordem *Xanthomonadales*, tais como *X. fastidiosa* na doença de Pierce, *X. oryzae* pv. *oryzae* na mancha foliar bacteriana do arroz, e *X. campestris* pv. *vesicatoria* na Mancha-bacteriana de tomate (APARNA *et al.*, 2009; TAMIR-ARIEL *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2016). Contudo, ainda se encontram muitas lipases extracelulares classificadas como proteínas hipotéticas, dos quais se desconhecem sua importância na patogenicidade dos microrganismos.

### **Lipases extracelulares**

As hidrolases são enzimas hidrolíticas versáteis que atuam na interface orgânica-aquosa. Nesta classe enzimática se encontram diversos grupos, como o grupo das enzimas que atuam em ligações éster (carboxil éster hidrolases - E.C. 3.1.1.x), onde as lipases (triacilglicerol acilhidrolase, E.C. 3.1.1.3) e esterases (E.C.3.1.1.1) são enquadradas (ENZYME NOMENCLATURE, 2010).

Definidas como enzimas que catalisam a hidrólise ou síntese de acilgliceróis de cadeia longa (acima de 14 átomos de carbono), as lipases também podem hidrolisar gliceróis ésteres de cadeia curta (menor que 10 átomos de carbono)

dependendo das condições, sendo a hidrólise destes substratos uma atividade característica de esterases (JESEN, 1983).

As lipases extracelulares desempenham vários papéis importantes aos microrganismos que as secretam, tais como a digestão de lipídeos para a obtenção de nutrientes, interações sinérgicas com outras enzimas, adesão às células e tecidos hospedeiros, iniciação do processo inflamatório, defesa através da lise da microflora no processo competitivo, dentre outras funções (SCHALLER *et al.*, 2005).

Algumas enzimas hidrolíticas, como é o caso das lipases, compartilham um padrão conformacional comum, denominado conformação  $\alpha/\beta$  de hidrolase, onde se encontra a tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu. Tal padrão de dobramento consiste em oito estruturas  $\beta$  paralelas, sendo que a folha  $\beta_2$  se encontra em posição antiparalela e as folhas  $\beta_3$  até a  $\beta_8$  conectadas em  $\alpha$ -hélices. As estruturas das enzimas lipásicas se diferem umas das outras pela curvatura das folhas  $\beta$ , assim como nas posições espaciais das  $\alpha$ -hélices topologicamente equivalentes (OLLIS, *et al.*, 1992; JAEGER *et al.*, 1999).

As enzimas lipolíticas apresentam afinidade por compostos insolúveis em água e continuam adsorvidas na interface óleo/água para subsequente hidrólise do substrato (ARPIGNY & JAEGER, 1999). Estas enzimas apresentam um aumento pronunciado da atividade quando estão presentes na interface óleo/água, fenômeno chamado de ativação interfacial (JAEGER *et al.*, 1999). Esse aumento da atividade ocorre devido a um rearranjo estrutural na região do sítio ativo, ao qual é coberto por uma cadeia peptídica denominada tampa que, ao sofrer uma alteração conformacional devido à presença de substâncias hidrofóbicas, se abre permitindo a catálise (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991; DEREWENDA *et al.*, 1992). Porém, há lipases que são desprovidas de tampa e não apresentam ativação interfacial (JAEGER *et al.*, 1999).

Na literatura já se encontram descritas várias funções das lipases extracelulares relacionadas à patogenicidade de microrganismos. No gênero *Xanthomonas*, Aparna e colaboradores (2009) descreveram em seu trabalho o papel da lipase/esterase (LipA) em *X. oryzae* pv. *oryzae*, a qual está relacionada com a degradação de parede celular em células de arroz e é capaz de induzir resposta imune do hospedeiro, como a apoptose e deposição de calose. Em outro

trabalho, Nascimento e colaboradores (2016) analisaram o secretoma de *X. fastidiosa* Temecula 1, uma das cepas responsáveis por causar a Doença de Pierce, e observaram que a lipase/esterase LesA, codificada pelo gene PD1703, está intimamente relacionada com as necroses em folhas de videiras. Todavia, até o presente momento, não há estudos a respeito da caracterização bioquímica e funcional da lipase/esterase LesA codificada pelo gene XAC0501 em Xac.

### **Proteína LesA**

LesA é uma enzima do tipo  $\alpha/\beta$  hidrolase de aproximadamente 42 kDa, codificada pelo gene XAC0501 de 1.158 pb em Xac. Quando Da Silva e colaboradores (2002) sequenciaram o genoma deste fitopatógeno, identificaram esta proteína como sendo uma proteína hipotética não caracterizada. Análises *in silico* revelaram que o gene XAC0501 codifica uma lipase/esterase ortóloga à enzima LipA, presente em diversas espécies do grupo das *Xanthomonas* (Figura 3) (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

Primeiramente descrita em *X. oryzae* pv. *oryzae*, a enzima LipA parece atuar de modo cooperativo com xilanases na promoção da virulência deste patógeno (RAJESHWARI *et al.*, 2005). Em 2007, pesquisadores observaram que mutantes de *X. oryzae* pv. *oryzae* para o gene *lipA*, bem como para o gene *clsA*, que codifica celulase, apresentaram virulência reduzida, todavia, mutantes para ambos os genes demonstram acentuada redução na patogenicidade quando comparados aos mutantes únicos, indicando a existência de uma redundância funcional em relação aos papéis desempenhados por essas enzimas na virulência de *X. oryzae* pv. *oryzae* (JHA *et al.*, 2007).



*Vitaceae*. Neste trabalho, os autores propuseram que a patogênese seria mediada via secreção de LesA através das OMVs, e que o acúmulo de LesA nas margens das folhas de videiras infectadas possui correlação direta com os sintomas iniciais observados na doença de Pierce e inversamente correlacionado com o título bacteriano.

Com base nos resultados encontrados na literatura, conjecturamos que a LesA, codificada pelo gene XAC0501 de *Xac*, poderia ter a mesma função e importância na virulência deste fitopatógeno. Portanto, neste trabalho nos propusemos a fazer a caracterização bioquímica da proteína LesA codificada pelo gene XAC0501 como enzima lipásica/esterásica e o seu papel na virulência a partir de mutantes *Xac* ( $\Delta Xac$ -LesA).



## 2. Objetivos

### Objetivo geral

Proceder com a caracterização bioquímica da proteína LesA de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 (Xac306), codificada pelo gene XAC0501, e investigar sua importância na patogênese da doença do cancro cítrico.

### Objetivos específicos

- Obter o mutante de Xac306 ( $\Delta$ Xac-LesA) para o gene *lesA* e caracterizar a virulência e patogenicidade *in planta*;
- Determinar os secretomas por espectrometria de massa (LC-MSMS) da Xac306 *in planta* e *in vitro* com três condições diferentes de meio de cultura;
- Realizar análises *in silico* dos secretomas obtidos;
- Expressar a proteína LesA recombinante em células de *Escherichia coli*, purificar e proceder com o ensaio de hipersensibilidade *in planta*;
- Proceder com a caracterização bioquímica das atividades lipásica e esterásica dos clones de  $\Delta$ Xac-LesA e de Xac306 cepa selvagem (Xac306<sub>wt</sub>), das amostras proteicas obtidas das três condições diferentes de meio de cultura e após a indução da expressão em *E. coli*.

### **3. Material e métodos**

#### **3.1. Linhagem bacteriana, manutenção e condições de cultivo.**

A partir de estoques a -80°C em meio Caldo Nutriente (*Nutrient Broth* – NB, Difco™, BD Diagnostics) contendo glicerol a 25%, as linhagem Xac306<sub>wt</sub> e  $\Delta$ Xac306-LesA foram cultivados em meio NB com aeração (220 rpm) a 28°C. O meio de cultivo sólido foi o mesmo com adição de 1% de agar bacteriológico. Como meio seletivo para o cultivo das mutantes, o meio de cultura foi suplementado com 10 µg/mL de canamicina. A linhagem Xac306 foi gentilmente cedida pelo Dr. Chuck Farah.

Para a expressão heteróloga de proteína recombinante LesA foi utilizada a linhagem de *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ , a partir de estoques a -80°C em meio Luria-Bertani (LB) contendo glicerol a 25%. O cultivo desta bactéria foi realizado em meio LB a 37°C sob agitação constante de 220 rpm. O meio de cultivo sólido foi o mesmo com adição de 1% de agar bacteriológico. Como meio seletivo para o cultivo das bactérias transformadas o meio foi suplementado com 50 µg/mL canamicina, antibiótico que o plasmídeo inserido confere resistência.

#### **3.2. Obtenção do mutante de Xac306 ( $\Delta$ Xac-LesA) para caracterizar a virulência e patogenicidade *in planta*.**

##### **3.2.1. Construção e síntese do vetor plasmidial para a obtenção do mutante $\Delta$ Xac-LesA.**

Com a finalidade de se construir o vetor plasmidial do gene mutado correspondente à ORF XAC0501 ( $\Delta$ Xac-LesA), o mesmo foi sintetizado quimicamente (GenScript, USA) inserindo-se na porção central do gene alvo (posição Ser-200, o primeiro aminoácido pertencente à tríade catalítica) o gene de resistência à canamicina, mantendo-se as extremidades 5' e 3' inalteradas de modo a permitir a recombinação homóloga.

### **3.2.2. Preparação de células competentes e eletroporação de Xac306<sub>wt</sub> para a obtenção dos mutantes.**

Para a eletroporação de Xac306<sub>wt</sub> foram utilizadas 50 µL de células eletrocompetentes e 2,5 µg/µL de DNA plasmidial. As células eletrocompetentes proveram de uma colônia isolada de Xac306<sub>wt</sub>, ao qual foi transferida para um erlenmayer contendo 25 mL de meio NB. Estas células foram cultivadas por 18 horas a 28°C sob agitação constante de 220 rpm. Após esse período, a cultura foi transferida para um tubo de propileno de 50 mL centrifugada a 5000 x g por 10 minutos a 4°C. As células foram lavadas duas vezes com Tampão fosfato-salino (PBS 1x, NaCl 80,0 g/L, KCl 2,0 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0 g/L pH 7,4) esterilizada e gelada, em seguida, foram lavadas duas vezes com 5 mL de glicerol 10% gelado e esterilizado. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 1%, ficando prontas para a transformação.

Para a transformação, adicionou-se à uma alíquota contendo 50 µL de células eletrocompetentes, 2,5 µg/µL de DNA plasmidial e 1 µL do inibidor de endonuclease *TypeOne™ Restriction Inhibitor* (Epicentre). Essa mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 cm. A cubeta contendo as células e o DNA transformante foi colocada no aparelho “Rad Gene Pulser” programado nos seguintes parâmetros: 2,5 kV, 200 Ω e 25 µF, gerando um pulso de aproximadamente 5 ms. Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio NB líquido às células eletroporadas que foram cultivadas por 3 horas com aeração (220 rpm) a 28°C. Aliquotas de 250 µL dessas células foram semeadas em meio NB sólido contendo 10 µg/µL de canamicina. As placas foram incubadas a 28°C até o surgimento das primeiras colônias.

### **3.2.3. Caracterização molecular do mutante ΔXac-LesA.**

Para a confirmação e caracterização molecular do locus mutado, os oligonucleotídeos *forward* XacLesA1F (5'GTGACCACTCACGCTTCTT-3') e *reverse* XacLesA1R (5'CAACCATCGTACCCACTCTATC-3') foram sintetizados e utilizados para a amplificação e isolamento do gene. A extração de DNA foi realizada com o kit de purificação *MasterPure Complete DNA and*

*RNA Purification Kit* (Epicentre Technologies, Madison, USA). As reações de PCR foram realizadas com 100 ng de DNA de  $\Delta$ Xac-LesA e de Xac306<sub>wt</sub>, 10  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo, 1U de LA Taq DNA polimerase (Takara Biomedicals, Inc. Otsu, Shiga, Japan), 2,5 mM de dNTPs (Takara Biomedicals, Inc. Otsu, Shiga, Japan), 50 mM de MgSO<sub>4</sub> e 1X tampão de Taq polimerase (Takara Biomedicals, Inc. Otsu, Shiga, Japan). Em um termociclador da MJ Research modelo PTC 100 e um programa com desnaturação inicial de 94°C, por 5 minutos; seguidos de 35 ciclos de 94°C, por 45 segundos; 55°C, por 45 segundos, e 72°C, por 3 minutos, e finalizando com um período de 10 minutos a 72°C. A análise do produto das reações de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, e coloração com brometo de etídeo.

#### **3.2.4. Teste de virulência e patogenicidade *in planta*.**

A fim de confirmar se haveria ocasionado alteração na patogenicidade e/ou virulência nas células mutantes, culturas de 20 mL das linhagens mutantes e da linhagem selvagem foram crescidas em meio líquido NB por 18 horas a 220 rpm. Após esse período de cultivo as amostras foram centrifugadas (5000 x g, 10 minutos, 4°C) e lavadas duas vezes com água ultrapura (Milli Q, Millipore) estéril. As células, após as lavagens, foram ressuspensas em 1 mL de água ultrapura. Foi medida a densidade óptica (OD), e de acordo com essa densidade as amostras foram diluídas até atingir a OD desejada de 0,3 (Abs 595). Essa suspensão foi então infiltrada na superfície inferior das folhas das mudas de laranja (*Citrus sinensis*), variedade Valência de aproximadamente 50 cm de altura. A infiltração ocorreu com o auxílio de uma seringa, em local previamente perfurado com agulha, até encharcar o limbo da folha. Os tratamentos desse experimento foram 6 clones do mutante, a linhagem selvagem e um controle negativo onde as plantas foram inoculadas apenas com água ultrapura. Após 35 dias da inoculação se avaliou a incidência da doença e a sintomatologia das folhas foram registradas por meio de fotografia digital.

### **3.3. Determinação do secretoma por espectrometria de massa (LC-MSMS) da *Xac in planta*.**

#### **3.3.1. Inoculação de *Xac306*<sub>wt</sub> em folhas de citros.**

A cultura de *Xac306*<sub>wt</sub> foi cultivada em 20 mL de meio líquido NB por 18 horas a 220 rpm. Após esse período de cultivo as amostras foram centrifugadas (5000 x g, 10 minutos, 4°C), lavadas duas vezes com Água ultrapura (Milli Q, Millipore) estéril e ressuspensas em 1 mL de água ultrapura. Foi medida a densidade óptica (OD), e de acordo com essa densidade as amostras foram diluídas até atingir a OD desejada de 0,3 (Abs 595 nm). Essa suspensão foi então infiltrada na superfície inferior das folhas das mudas de laranja (*Citrus sinensis*), variedade Valência com 3 meses de idade e aproximadamente 50 cm de altura. A infiltração ocorreu com o auxílio de uma seringa, em local previamente perfurado com agulha, até encharcar a folha. Um par de folhas de laranjeira, previamente lavadas com água destilada, foram coletados nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias após infecção com a linhagem selvagem, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas no freezer a -80°C.

#### **3.3.2. Extração das proteínas totais de folhas de citros inoculadas com *Xac306*<sub>wt</sub>.**

As proteínas foliares foram extraídas de acordo com o protocolo descrito por Schuster e Davies (1983), com modificações. Cada folha foi macerada em nitrogênio líquido usando um pistilo e almofariz contendo 1 % (m/m) de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Foi utilizado 1 mL de tampão de extração (0,7M sacarose, 0,1 M KCL, 0,5 M Tris-HCl pH7.5, 0,5 M EDTA, 1 mM PMSF and 2% β - mercaptoethanol) para ressuspender cada 100 g de material obtido. A suspensão foi homogeneizada três vezes (1 minuto cada). Em seguida foi acrescentado o mesmo volume de fenol tamponado pH 8, e homogeneizado novamente. Após centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, a parte superior fenólica foi removida e armazenada, o sedimento remanescente foi submetido a re-extração com a adição de tampão de extração. As proteínas presente na fase fenólica

foram precipitadas por 18 horas a -20°C, acrescentando cinco vezes o volume da solução de 100 mM de acetato de amônio gelado em metanol. Após centrifugar (12.000 x g, 15 minutos a 4°C), os pellets proteicos foram lavados cinco vezes com 5 mL de 100 mM de acetato de amônio gelado em metanol e secos por 10 minutos em capela de fluxo laminar. Proteínas foram ressuspensas com tampão uréia [7 M uréia, 2 M tiourea, 40 mM Tris, 2% Chaps e 18 mM Ditioneitol (DTT)]. As concentrações proteicas foram determinadas pelo método de Bradford usando a curva de BSA como padrão.

### **3.3.3. Análise do perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).**

Para verificar a presença de proteínas e permitir a normalização entre as amostras que seguiriam para a liofilização e posteriormente a espectrometria de massa (LC-MSMS), se procedeu com o método de eletroforese SDS/PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate –Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) em gel 12,5% (LAEMMLI, 1970). Foram adicionados 9 µL de tampão de amostra 4x (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 0,2% azuldebromofenol; 4% β-mercaptoetanol) as alíquotas contendo 10 µg das amostras proteicas das folhas de citros nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias após infecção por Xac306<sub>wt</sub>, diluídas em água ultrapura (Milli Q, Millipore). Estas foram aquecidas a 100°C por 8 minutos e submetidas a eletroforese unidimensional em sistema Mini-PROTEAN® Treta CELL (Bio-Rad) em tampão de corrida (125 mM Tris; 0,5% SDS; 960 mM de glicina) a uma voltagem constante de 80V até o final da corrida. O gel foi corado com Coomassie Blue R250, para a comparação do perfil das amostras. A amostra de 12 dias após a inoculação seguiu para a liofilização e posteriormente a LC-MSMS, devido ao seu perfil proteico similar ao ápice da infecção.

### **3.3.4. Tripsinização e análise por espectrometria de massa.**

Para a análise secretoma *in planta*, as proteínas extraídas das folhas com 12 dias de infecção foram precipitadas utilizando o kit de precipitação de proteínas ProteoExtract™ (Calbiochem) e desidratadas overnight em capela de exaustão. O

sedimento proteico obtido foi ressuspenso em uma 50 mM AmBic pH 8,0 e submetido a digestão em solução contendo tripsina. O equipamento QExactive (Thermo Fisher Scientific) acoplado a um cromatógrafo líquido Easy-LC (Thermo Fisher Scientific) e uma fonte de ionização do tipo nanospray foram utilizados para as análises por espectrometria de massa. Os peptídeos foram aplicados em um loop (100 micron, C18 100Å 5U) e dessalinizados “*in tandem*” usando uma coluna de cromatografia de fase reversa (75 micron, C18 200Å 3U). Para a separação dos peptídeos realizou-se um gradiente com os solventes 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e ACN 100% (solvente B) em um tempo de 60 minutos de duração. A aquisição dos dados foi realizada utilizando um método MS/MS que abrange a faixa de massa molecular de 300 a 1600 Da com uma resolução de 70.000 Da. A fonte de ionização nanospray foi operada usando uma voltagem de 2,2 kV e uma temperatura de 250°C é transferida para o capilar. Os dados obtidos foram analisados usando o software X!Tandem e visualizados usando o software Scaffold Proteome (versão 3.01). As proteínas foram analisadas utilizando o banco de dados Uniprot associado ao banco de dados cRAP que reconhece os contaminantes de laboratório mais comuns. Foram utilizados bancos de dados reverse decoy antes das análises no X!Tandem.

### **3.4. Determinação do secretoma por LC-MSMS de Xac306<sub>wt</sub> em três condições diferentes de meio de cultura.**

#### **3.4.1. Preparo do extrato aquoso foliar de citros.**

Folhas de laranja foram lavadas com água destilada, coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram pesadas, maceradas em nitrogênio líquido usando um pistilo e almofariz e colocadas em tubos de propileno de 50 mL contendo água destilada na proporção 1:3 (m/v). Após homogeneizar, vortexar e centrifugar (8.000 x g, 30 minutos a 4°C) a amostra foi filtrada em funil de Buckner contendo papel-filtro 0,45 µm acoplado a uma bomba elétrica a vácuo. O extrato foi mais uma vez filtrado em filtro para seringa de 0,22 µm para remover contaminantes, garantindo a esterilidade.

### **3.4.2. Cultivo de Xac306<sub>wt</sub> em meios de cultura indutivos XAM1 e XAM1-Ex e em meio NB.**

Com a finalidade de comparar o perfil de proteínas secretadas pela Xac306<sub>wt</sub> quando cultivada em meio indutor de virulência, XAM1 (7,5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 33 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 60 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,7 mM Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>; 0,9 mM MgSO<sub>4</sub>; 9,9 mM Frutose; 9,9 mM Sacarose; 0,03% caseína hidrolisada) e XAM1-Ex (XAM1 com 30% de extrato aquoso foliar de *Citrus sinensis*), e não indutor NB, Culturas de 100 mL foram mantidas durante 18 horas no agitador a 220 rpm a 28°C. Após esse período, a cultura foi transferida para tubos de propileno de 50 mL e centrifugada (7000 x g por 10 minutos a 4°C). O sobrenadante foi coletado e concentrado (10 vezes) em sistema de ultrafiltração (Amicon Ultra, Millipore) com poro de 10 KDa, centrifugando a 5.000 x g a 4°C e armazenada no freezer a -80°C, até ser utilizado. O sedimento Obtido da centrifugação também foi coletado e armazenado no freezer a -80°C.

### **3.4.3. Extração de proteína pelo método TCA/Acetona.**

As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com ácido tricloroacético (TCA) e acetona utilizando o protocolo descrito pela empresa BRC (2002), com algumas modificações. Esse método consisti em adicionar na proporção 1:8:1 das soluções de sobrenadante concentrado/ acetona gelada/ TCA, misturando cada amostra e deixando descansar durante 48 horas a uma temperatura de -20°C. Em seguida se procede à centrifugação (5000 x g durante 30 minutos a uma temperatura de 4°C) e o descarte do sobrenadante. O precipitado foi lavado quatro vezes com acetona gelada para remover resíduos de TCA, sendo que após cada lavagem a amostra era centrifugada a 5000 x g durante 30 minutos a uma temperatura de 4°C. Com a finalidade de remover toda a acetona, o precipitado proteico foi exposto a temperatura ambiente por 10 minutos. As alíquotas foram dissolvidas em 50uL de tampão de solubilização de proteína (10 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,5% SDS; 100 mM de DTT; 5mM de EDTA; 1 mM de PMSF) e as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford usando a curva de BSA como padrão.



#### **3.4.4. Análise do perfil proteico por SDS-PAGE e LC-MSMS.**

O processo para analisar os diferentes perfis de proteínas secretadas existentes entre os meios de cultura CN, XAM1 e XAM1-Ex e permitir a normatização entre as amostras que seguiriam para a liofilização e posteriormente a espectrometria de massa (LC-MSMS) foram os mesmos descritos nas sessões 3.3.3 e 3.3.4.

### **3.5. Expressão de LesA recombinante em *E. coli* e teste de hipersensibilidade *in planta*.**

#### **3.5.1. Construção e síntese do vetor plasmidial para a obtenção da proteína recombinante LesA.**

A expressão heteróloga da proteína LesA foi realizada clonando-se o gene *lesA* (XAC0501) no vetor plasmidial pJexpress 401 (DNA2.0, USA), sob regulação do promotor T5. A inserção do gene clonado foi confirmada por PCR utilizando-se primers flanqueando o gene *lesA*, seguido pela transformação de células *E. coli* DH5 $\alpha$  eletrocompetentes.

#### **3.5.2. Preparação de células competentes e eletroporação de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ .**

O plasmídeo recombinante (Xac *lesA* CF-1) e o plasmídeo vazio (EV) foram transformados em *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  eletrocompetentes tal como descrito na sessão 3.3.2, utilizando 0,3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de DNA plasmidial. Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de meio LB líquido as células eletroporadas que foram cultivadas por 1 hora com aeração (220 rpm) a 37°C. Aliquotas de 200  $\mu\text{L}$  dessas células foram semeadas em meio LB sólido contendo 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de canamicina. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas, tempo suficiente para o surgimento de colônias. As placas foram armazenadas em câmara fria a 4°C.

### **3.5.3. Expressão heteróloga da proteína recombinante de Xac (LesA).**

Para expressão de proteínas recombinantes, cepas bacterianas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com os plasmídeos de interesse ou com o plasmídeo vazio, foram cultivadas em 5 mL de meio de cultura LB com canamicina (50  $\mu$ g/mL), mantidos sob agitação em torno de 220 rpm à temperatura de 37°C por 18 horas. Após este período a cultura foi diluída na proporção 1:100 em meio LB com canamicina e mantida nas mesmas condições de crescimento citadas acima, até a cultura atingir uma densidade óptica de 0,8 (Abs 600 nm). Quando a absorbância desejada foi atingida, foi adicionado 1 mM de IPTG em ambas as condições, promovendo a expressão. A ativação das bactérias contendo os plasmídeos foi realizada por 3 horas a 30°C, com aeração (120 rpm). Após esse período, a cultura foi transferida para tubos de propileno de 50 mL, centrifugada (5000 x g por 30 minutos a 4°C) e o sedimento foi armazenado no ultrafreezer a -80°C.

### **3.5.4. Extração da proteína recombinante e confirmação por *Western blotting*.**

Para extração da proteína, a amostra DH5 $\alpha$ -LesA foi submetida à lise celular. Foi adicionado 1 mL de tampão de lise (1 M Tris-HCl pH 7,5; 5 M de NaCl; 10 mg/mL de lisozima; 1% glicerol; 100 mM de benzamidina; 0,5 M de EDTA; 100 mM de PMSF) no sedimento celular, foi vortexado por cinco vezes e colocado em banho degelo, 5 minutos cada processo cada vez. Essa suspensão foi centrifugada a 8.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado.

Para confirmar a identidade da proteína presente no extrato bruto foi realizado o ensaio de *Western Blotting*. O processo de preparação do gel de poliacrilamida e a eletroforese são os mesmos citados na sessão 3.3.3. As bandas das proteínas obtidas no gel de poliacrilamida são transferidas para a membrana de nitrocelulose (Hybond TM-C extra, Nitrocellulose, 45 Micron – Amersham Life Science), através do sistema “Mini Protein Tetra Cell” (BioRad), utilizando tampão

de transferência gelado (Tris-HCl 25mM pH 8,3; glicina 192mM e 20% de metanol) à 4°C, com corrente de 50 mA, overnight.

Ao término da transferência, a membrana foi corada com vermelho *Ponceau* para confirmar a transferência das proteínas para a membrana. Após a visualização das bandas, a membrana foi lavada em água destilada para a retirada do corante e, em seguida, foi adicionado à solução de bloqueio PBS-M 5% (5% leite em pó desnatado em tampão PBS 1x) por uma hora à temperatura ambiente. Após a etapa de bloqueio, a membrana foi lavada por cinco vezes com PBS-Tween 0,05% (0,05% Tween-20 em PBS 1x). Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-flag marcado com peroxidase (1:1000) em PBS-M 1% (1% de leite em pó desnatado em PBS 1x) por 3 horas, à temperatura ambiente. Após esta incubação, a membrana foi novamente lavada por cinco vezes com PBS-Tween 0,05% e submetida ao procedimento de revelação.

A visualização das bandas foi realizado através do emprego do substrato quimioluminescente ECL (Enhanced Chemiluminescence) (GE Healthcare) e de filmes de raio-X ultra-sensíveis (Amersham Hyperfilm ECL) (GE Healthcare). Os filmes foram expostos a membrana por aproximadamente 5 e 20 minutos, sendo que todos os procedimentos se deram em câmara escura. Os reagentes de revelação e fixação utilizados foram provenientes da Kodak.

### **3.5.5. Ensaio de hipersensibilidade em folhas *Nicotiana tabacum*.**

Almejando observar se a proteína LesA é capaz de induzir isoladamente uma resposta de hipersensibilidade, 6 µg de proteína LesA purificada em suspensão foi infiltrada na superfície inferior das folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), com 2 meses de idade e aproximadamente 30 cm de altura. A infiltração ocorreu com o auxílio de uma seringa, em local previamente perfurado com agulha, até encharcar a folha. Em seguida, se esperou ocorrer o amarelamento da folha no local da infecção para registrar o resultado obtido.

### **3.6. Caracterização bioquímica das atividades lipásica e esterásica.**

#### **3.6.1. Atividade lipásica das colônias *Xac<sub>wt</sub>*, $\Delta Xac$ e *DH5 $\alpha$ -LesA*.**

Placas de Petri contendo os seguintes meios sólidos XAM1, XAM1-Ex, CN e LB emulsificados com 1% do volume de tributirina foram preparados. Com os meios de cultura solidificados, as placas foram divididas em quadrantes, onde cada quadrante foi inoculado com 2  $\mu$ L da respectiva amostra provinda de uma cultura em meio líquido. Nas placas contendo os meios sólidos XAM1, XAM1-Ex e CN foram inoculados colônias de *Xac<sub>wt</sub>*, para se proceder com a análise comparativa entre os níveis de secreção frente as diferentes condições de cultivo. Com a finalidade de observar se houve ou não redução significativa na atividade lipásica de  $\Delta Xac$  em relação a inoculamos as amostras em meio CN. Além disso, nas placas contendo meio LB foram cultivadas com colônias de *DH5 $\alpha$ -LesA* e *DH5 $\alpha$ -EV* afim de visualizar e comparar a capacidade de secreção de proteínas com características lipásicas. Após este procedimento as placas foram incubadas (*Xac<sub>wt</sub>* e  $\Delta Xac$  a 28°C e *DH5 $\alpha$ -LesA* e *DH5 $\alpha$ -EV* a 37°C) até o surgimento do halo ao redor das colônias.

#### **3.6.2. Atividade lipásica do sobrenadante e do lisado de *DH5 $\alpha$ -LesA*.**

Para analisar os diferentes níveis de lipases presente sobrenadante e do lisado da cultura de *DH5 $\alpha$ -LesA* e *DH5 $\alpha$ -EV*, foram preparadas placas de Petri contendo meio sólido de Agarose-Tributirina (1% tributirina; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 mM CaCl<sub>2</sub>; 2% agarose). Após solidificar, a placa foi dividida em quatro quadrantes nos foram feitos orifícios. Em seguida, as células foram lisadas com 1 mL de tampão de lise (1 M Tris-HCl pH 7,5; 5 M NaCl; 10 mg/mL lisozima; 1% glicerol; 100 mM benzamidina; 0,5 M EDTA; 100 mM PMSF). Cada orifício recebeu 200  $\mu$ L de cada amostra. As placas foram incubadas a 28°C por 7 dias, tempo suficiente para o surgimento dos halos de degradação de tributirina entorno dos orifícios.

### 3.6.3. Ensaio da atividade esterásica

Para realização do ensaio de atividade enzimática foram utilizadas as amostras referentes ao sobrenadante concentrado das três condições diferentes de meio de cultura e do lisado de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  após a indução da expressão. O ensaio procedeu em triplicada, utilizando 2,5  $\mu$ g de proteínas e durante a montagem do experimento a placa foi mantida no gelo. Foram adicionados em uma placa opaca 20  $\mu$ L de amostra por poço, quando necessário completou o volume com PBS 1x. Em seguida, ao abrigo de luz, adicionou-se 80  $\mu$ L de 4-MUB 5mM (1,25 mg 4-MUB; 125  $\mu$ L DMSO; 1,25  $\mu$ L de triton x -100) em tampão citrato (0,1M ácido cítrico, 0,05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5). A placa foi lida nos tempos 0, 10, 20 e 30 minutos à 30°C, 365 nm de excitação e 455 nm de emissão, no fluorímetro leitor de placas Multimode (EnSpire).

## 4. Resultados

### 4.1. Caracterização molecular, da virulência e patogenicidade dos mutantes $\Delta Xac$ -LesA *in planta*.

Para poder validar os experimentos e conclusões sobre a influência do gene *lesA* na virulência e patogenicidade em *X. axonopodis* pv. *citri*, os mutantes obtidos através das técnicas descritas na sessão 3.2, foram submetidos a caracterização molecular provinda da visualização do lócus mutado pela banda presente no gel de agarose 1% (figura 4).

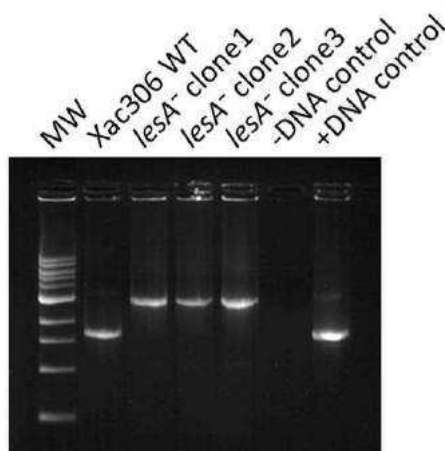
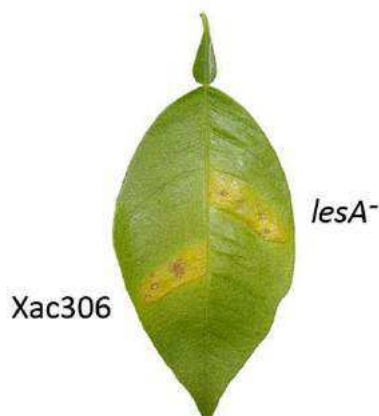


Figura 4. Confirmação da interrupção do gene *lesA* em Xac306 através da amplificação por PCR.

Com a finalidade de constatar a importância da LesA na virulência e patogenicidade do fitopatógeno em estudo, folhas de laranjeira (*Citrus sinensis*; variedade Valência) foram inoculadas com Xac306<sub>wt</sub> e  $\Delta Xac$ -LesA. Após 35 dias da inoculação, as folhas apresentaram os sintomas da doença (Figura 5).

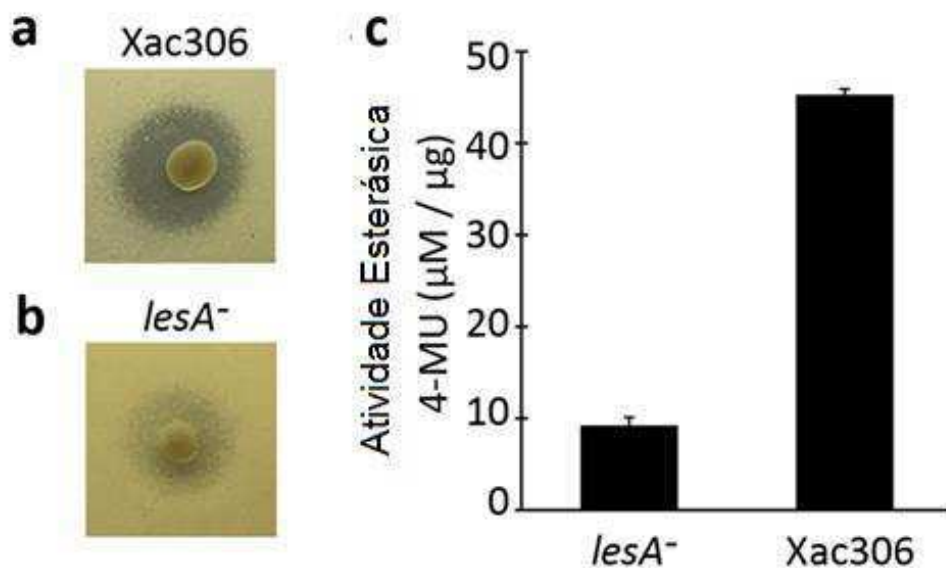


**Figura 5. Folha de *Citrus sinensis* infectada com *X. axonopodis* pv. *citri* str. 306 e o mutante *lesA*<sup>-</sup>.** Sintomas induzidos pela infiltração em folhas de laranja Valência com *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac306*<sub>wt</sub>); mutantes de *Xac306* ( $\Delta$ *Xac-LesA*) e o controle negativo composto por água.

O resultado deste ensaio demonstrou que os sintomas produzidos pelo mutante  $\Delta$ *Xac-LesA*, quando inoculado em folhas de laranja da qualidade Valência, foram menos severos quando comparados à estirpe selvagem e apresentaram menor expansão dos sintomas nos locais de infiltração da suspensão celular.

#### **4.2. Caracterização bioquímica da atividade lipásica e esterásica dos mutantes.**

Visando verificar se os mutantes utilizados neste estudo apresentam atividade lipásica e esterásica reduzida, quando comparados à cepa selvagem, foi realizado ensaios para caracterizar bioquimicamente a atividade dessa enzima nas amostras de  $\Delta$ *Xac-LesA* e *Xac306*<sub>wt</sub> (sessões 3.6.1 e 3.6.4). As colônias de células de  $\Delta$ *Xac-LesA* e da cepa selvagem *Xac306*<sub>wt</sub> foram submetidas ao teste de atividade lipásica com a finalidade de se observar a capacidade de degradação de lipídeos de cadeia curta (Figura 6 A e B). Os mutantes apresentaram um halo de degradação menor que o da cepa selvagem, uma vez que o mutante apresenta o gene *lesA* não funcional, reduzindo assim sua capacidade em hidrolisar lipídeos.



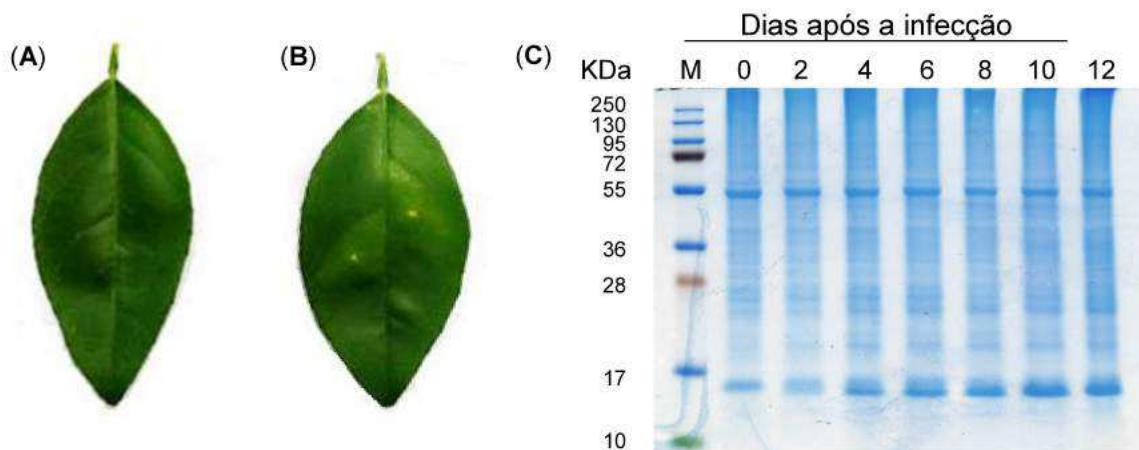
**Figura 6. Caracterização das atividades lipásica e esterásica dos mutantes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 para o gene *lesA*.** (A) Presença do halo de degradação devido à hidrólise da tributirina ao redor das colônia da cepa selvagem de *X. axonopodis* pv. *citri* str. 306 e o (B) mutante para o gene *lesA*. (C) Atividade esterásica utilizando 4-MUB como substrato.

O ensaio da atividade esterásica (Figura 6c) demonstrou que o mutante  $\Delta$ Xac-LesA, por não apresentarem o gene *lesA* funcional, apresentou capacidade de degradação de ésteres de cadeia curta 4,5 vezes menor que a da cepa selvagem.

#### 4.3. Caracterização proteômica das proteínas secretadas por Xac306<sub>wt</sub> in planta.

A análise do secretoma teve como finalidade identificar a presença da proteína LesA, assim como outros potenciais fatores de virulência secretados pela *X. axonopodis* pv. *citri* em citros. As folhas foram coletadas (Figura 7A e B), tiveram suas proteínas extraídas, quantificadas e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, utilizando 10 μg de proteínas (Figura 7C). A intensidade entre as bandas das amostras foi similar, demonstrando que a extração e a quantificação das proteínas foram realizadas com sucesso.





**Figura 7. Folhas de *Citrus sinensis* infectadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 e SDS-PAGE das proteínas extraídas. (A) Folha não-infectada. (B) Folha infectada por *X. axonopodis* pv. *citri* após 12 dias da inoculação mecânica. (C) Análise do perfil eletroforético dos extratos proteicos de folhas de *Citrus sinensis* infectadas por *X. axonopodis* pv. *citri*.**

A análise proteômica por LC-MSMS permitiu a identificação de 959 proteínas totais, sendo 20 originadas do fitopatógeno Xac306 (Tabela 1).

**Tabela 1. Proteínas secretadas *in planta* por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 em citros identificadas por espectrometria de massas.**

Número de acesso <sup>1</sup>	Descrição da proteína	Gene ID	Local prot. <sup>2</sup>	Peso mol. teórico <sup>3</sup>	Peptídeo signal <sup>4</sup>	SecP score <sup>5</sup>
<b>A0A098JHL1_XANCI</b>	Alpha-amino acid ester hydrolase	XAC3610_6210004	D	21 kDa	-	0.928988
<b>A0A098JAM7_XANCI</b>	Flagellar FliJ protein	XAC3610_5300008	D	9 kDa	-	0.123649
<b>A0A098KGH7_XANCI</b>	Helicase domain protein	XACB302_11010001	C	45 kDa	-	0.083430
<b>A0A098I513_XANCI</b>	Histidine kinase-response regulator hybrid protein	XACLE3_5440002	C	156 kDa	-	0.129724
<b>A0A098HSL8_XANCI</b>	Hydrolase	XACG102_2150004	D	7 kDa	-	0.355616
<b>A0A098HIX3_XANCI</b>	Metalloproteinase	XACG102_1100002	E	49 kDa	-	0.954419
<b>A0A098IBD1_XANCI</b>	Methyl-accepting chemotaxis protein I	XAC3615_5520002	MC	24 kDa	-	0.555935
<b>A0A098HQL5_XANCI</b>	Putative biopolymer transport protein ExbB-like	XACJK48_4040010	MC	22 kDa	-	0.176870
<b>A0A098HMC9_XANCI</b>	Putative peptidoglycan binding domain protein	XAC3607_2770006	P	35 kDa	31/32	0.932189
<b>A0A098J2N7_XANCI</b>	Putative trwC protein	XACLE3_8610006	C	110 kDa	-	0.116693
<b>A0A098K3J6_XANCI</b>	Relaxation protein	XAC3607_2530008	D	21 kDa	-	0.169482
<b>A0A098KDW8_XANCI</b>	Shikimate kinase	XAC3612_2420004	D	295 kDa	-	0.209064
<b>A0A098HTJ5_XANCI</b>	Uncharacterized protein	XACLE3_4320009	C	78 kDa	-	0.291440
<b>A0A098HDT2_XANCI</b>	Uncharacterized protein	XACJK48_2770002	P	27 kDa	-	0.735737
<b>A0A098HD19_XANCI</b>	Uncharacterized protein	XACG102_10850001	C	38 kDa	-	0.272496
<b>A0A098J9Q8_XANCI</b>	Uncharacterized protein	XAC3615_4780001	D	9 kDa	-	0.676128
<b>A0A098I666_XANCI</b>	Uncharacterized protein	XAC3610_11300006	MC	42 kDa	-	0.207819
<b>A0A098J866_XANCI</b>	Uncharacterized protein	XAC3615_4420001	D	9 kDa	-	0.135963
<b>A0A098J978_XANCI</b>	Uncharacterized protein	XACLE3_9030005	D	12 kDa	-	0.595128
<b>A0A098J266_XANCI</b>	Virulence regulator	XACLG97_7600007	D	15 kDa	-	0.156171

- 1: Número de acesso da proteína no UniProt Knowledgebase (UniProtKB; <http://www.uniprot.org/>);
- 2: Localização das proteínas predita pelo PSORTb v 3.0. Subcellular Localization Prediction Tool (<http://www.psort.org/psortb/>); C: citoplasma, D: desconhecido, E: proteínas extracelular, MC: membrana citoplasmática, P: periplasma
- 3: Peso molecular teórico da proteína em kDa;
- 4: Posição de clivagem do peptídeo sinal predita pelo SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);
- 5: Predição de secreção não-clássica de proteínas pelo SecretomeP Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) utilizado para proteínas que não apresentem peptídeo sinal. Score > 0,5 indica secreção não-clássica.

#### 4.4. Determinação do secretoma *in vitro* por LC-MSMS e caracterização bioquímica de Xac306<sub>wt</sub> em três condições diferentes de cultivo.

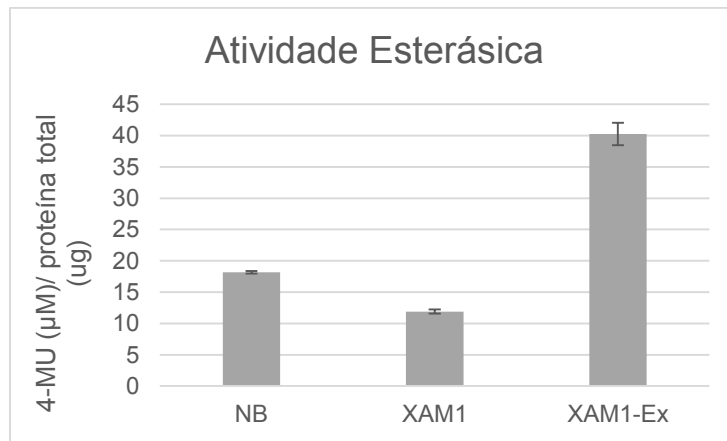
Com o objetivo de analisar os diferentes níveis de expressão e secreção de proteínas com atividade lipásica/esterásica em cada amostra, procedeu-se com os testes de caracterização bioquímica. Para o teste de atividade lipásica, colônias da cepa selvagem de Xac306 foram crescidas em seus respectivos meios sólidos contendo 1% do volume de tributirina. Neste experimento foi possível constatar a presença do halo de degradação, devido à hidrólise da tributirina (C4), ao redor das colônias nos três meios de cultivo (Figura 8).

Todavia, os meios de cultivo XAM1 e XAM1-Ex apresentaram halos de degradação maiores do que os encontrados ao redor das colônias cultivada em meio NB, indicando que os níveis de proteínas com atividade lipásica, incluindo possivelmente a proteína LesA, teriam sua expressão aumentada quando cultivadas em meio de cultura indutores de virulência (XAM1 e XAM1-Ex).



**Figura 8. Atividade lipásica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 cultivado sob condições diferentes *in vitro*.** Presença do halo de degradação no entorno da colônia de Xac306<sub>wt</sub> cultivada em meio (A) XAM1, (B) XAM1-Ex e (C) NB.

Para o teste de atividade esterásica, células cultivadas nos três diferentes meios de cultura foram coletadas e lisadas (Figura 9). A amostra do lisado de Xac306<sub>wt</sub> cultivado em meio XAM1-Ex, foi o que apresentou maior capacidade de degradação de ésteres de cadeia curta, diferente das amostras cultivadas em meio NB e XAM1.



**Figura 9. Atividade esterásica comparativa das proteínas secretadas por colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 cultivadas em três condições diferentes de meio de cultura.**

Com o intuito de analisar comparativamente a secreção de proteínas por *Xac306<sub>wt</sub>* cultivadas nos meios de culturas NB, XAM1 e XAM1-Ex e identificar potenciais fatores de virulência secretados pelo fitopatógeno em diferentes condições *in vitro*, as amostras foram submetidas à espectrometria de massa. No total, foram identificadas 140 proteínas (Tabela 2).

**Tabela 2. Proteínas secretadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 em três condições de cultivo identificadas por LC-MSMS.**

Número de acesso <sup>1</sup>	Descrição da proteína	Nome do gene	GeneID	XAM1-EX*	XAM1*	NB*	Local prot. <sup>2</sup>	Peso mol. teórico <sup>3</sup>	Peptídeo sinal <sup>4</sup>	SecP score <sup>5</sup>	Seq. cobertura	Matched dos peptídeos
Q8PPZ1	60 kDa chaperonin	<i>groL</i>	XAC0542	+++	+++	+	C	57 kDa	-	0.122193	10%	4
Q8PP84	Adenosylhomocysteinase	<i>ahcY</i>	XAC0804	++	++	+	C	53 kDa	-	0.067070	5%	2
Q8PN62	Catalase	<i>katE</i>	XAC1211	++	++	+	C	77 kDa	-	0.268476	8%	3
Q8PNS9	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	<i>rpoC</i>	XAC0966	+++	+	+	C	155 kDa	-	0.077518	5%	3
Q8NL22	Elongation factor Tu	<i>tufA</i>	XAC0957	+++	+	++	C	43 kDa	-	0.048020	14%	6
Q8PMZ9	TonB-dependent receptor	<i>fyuA</i>	XAC1276	+	++	+	OM	83 kDa	24/25	0.904001	4%	1
Q8PNN7	ABC transporter sulfate binding protein	<i>sbp</i>	XAC1017	-	++	+	P	38 kDa	24/25	0.126986	8%	2
Q8PFD7	Dipeptidyl peptidase IV	-	XAC4046	-	+	+	U	84 kDa	29/30	0.716932	6%	2
Q8PKT5	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	<i>sdhA</i>	XAC2077	-	++	+	CM	65 kDa	-	0.094411	6%	2
Q8PPF2	Alcohol dehydrogenase C	-	XAC0734	+	+++	-	C	39 kDa	-	0.100727	8%	1
Q8PNT0	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	<i>rpoB</i>	XAC0965	++	+	-	C	154 kDa	-	0.074750	2%	4
Q8PH13	Phosphomethylpyrimidine synthase	<i>thiC</i>	XAC3447	+	++	-	C	69 kDa	-	0.063211	4%	2
Q8PJK2	RhsD protein	<i>rhsD</i>	XAC2529	++	+	-	U	172 kDa	-	0.944114	4%	4
Q8PG33	RNA polymerase sigma factor RpoD	<i>rpoD</i>	XAC3788	+	+++	-	C	70 kDa	-	0.062703	3%	2
Q8PPE3	Serine hydroxymethyltransferase	<i>glyA</i>	XAC0743	+	++	-	C	45 kDa	-	0.270452	2%	2
Q8PMY6	Signal recognition particle protein	<i>ffh</i>	XAC1289	++	++	-	C	49 kDa	-	0.118830	17%	7
Q8PNF7	Uncharacterized protein	-	XAC1114	++	+	-	CM	72 kDa	-	0.469399	5%	3
Q8PMU2	Uncharacterized protein	-	XAC1333	++	+	-	U	60 kDa	-	0.119711	6%	1
Q8PN07	Uncharacterized protein	-	XAC1268	+	+	-	C	86 kDa	-	0.112535	4%	2
Número	Descrição da proteína	Nome	GeneID	XAM1-	XAM1*	NB*	Local	Peso	Peptídeo	SecP	Seq.	Matched

de acesso <sup>1</sup>		do gene		EX*			prot. <sup>2</sup>	mol. teórico <sup>3</sup>	senal <sup>4</sup>	score <sup>5</sup>	cobertura	dos peptídeos
Q8PH56	Uncharacterized protein	-	XAC3404	+	++	-	U	14 kDa	-	0.913454	29%	2
Q8PLB7	Aconitate hydratase 2	<i>acnB</i>	XAC1885	+	-	++	C	93 kDa	-	0.184996	6%	2
Q8PJT0	ATP-dependent DNA helicase	<i>lhr1</i>	XAC2450	++	-	++	U	162 kDa	-	0.098916	2%	2
Q8PLS6	Carboxypeptidase-related protein	-	XAC1713	+++	-	+	U	55 kDa	23/24	0.896877	10%	2
Q8PGI6	Copper resistance protein A	<i>copA</i>	XAC3630	++	-	++	P	66 kDa	-	0.285597	7%	1
Q8PHA7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>gapA</i>	XAC3352	+	-	+++	C	36 kDa	-	0.639831	24%	6
Q8PQJ5	Multidrug efflux transporter	<i>smeB</i>	XAC0328	+	-	+	C	111 kDa	-	0.187643	6%	1
Q8PKT4	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	<i>sdhB</i>	XAC2078	+	-	+	CM	29 kDa	-	0.223758	13%	2
Q8PFN6	Uncharacterized protein	-	XAC3942	+++	-	+	C	61 kDa	-	0.077684	15%	4
Q8PIC8	Uncharacterized protein	-	XAC2970	++	-	+	U	20 kDa	22/23	0.935422	13%	2
Q8PNC8	Uncharacterized protein	-	XAC1145	+	-	+	U	179 kDa	-	0.797743	2%	2
Q8PJI8	Uncharacterized protein	-	XAC2543	+	-	+++	C	67 kDa	-	0.261395	10%	2
Q8PJJ7	Uncharacterized protein	-	XAC2534	+	-	++	U	157 kDa	-	0.910722	2%	2
Q8PN12	Uncharacterized protein	-	XAC1262	+	-	+	U	63 kDa	-	0.875900	4%	1
Q8PHD3	Acriflavin resistance protein	<i>acrF</i>	XAC3326	++	-	-	C	112 kDa	-	0.094884	4%	2
Q8PQQ7	Acyl-CoA dehydrogenase	<i>acdA</i>	XAC0265	++	-	-	C	41 kDa	-	0.079449	6%	3
Q8PN69	Alanyl dipeptidyl peptidase	-	XAC1204	+	-	-	U	79 kDa	-	0.938131	9%	2
Q8PNY2	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F	<i>ahpF</i>	XAC0906	+	-	-	CM	57 kDa	-	0.068585	3%	2
Q8PGZ3	Alpha-1,2-mannosidase	-	XAC3469	+	-	-	U	123 kDa	-	0.906439	5%	2
Q8PLM2	Alpha-xylosidase	<i>xyIS</i>	XAC1773	+++	-	-	U	116 kDa	-	0.901680	2%	2
Q8PFQ6	ATP-dependent serine activating enzyme	<i>entF</i>	XAC3922	+++	-	-	U	146 kDa	-	0.083749	2%	2
Q8PLQ7	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	<i>hflB</i>	XAC1732	+	-	-	CM	71 kDa	-	0.074505	3%	2

Número de acesso <sup>1</sup>	Descrição da proteína	Nome do gene	GeneID	XAM1-EX*	XAM1*	NB*	Local prot. <sup>2</sup>	Peso mol. teórico <sup>3</sup>	Peptídeo sinal <sup>4</sup>	SecP score <sup>5</sup>	Seq. cobertura	Matched dos peptídeos
Q8PEU1	Beta-xylanase	<i>xynA</i>	XAC4249	+	-	-	U	42 kDa	16/17	0.540293	9%	2
Q8PMJ8	Bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme	<i>glnD</i>	XAC1429	+++	-	-	C	97 kDa	-	0.153725	4%	2
Q8PR07	C4-dicarboxylate transport system	<i>dctP</i>	XAC0162	++	-	-	P	37 kDa	-	0.099337	12%	2
Q8PMA9	Chaperone protein DnaJ	<i>dnaJ</i>	XAC1523	++	-	-	C	40 kDa	-	0.085664	16%	3
Q8PIN0	Chemotaxis histidine protein kinase	<i>cheA</i>	XAC2865	++	-	-	C	71 kDa	-	0.069804	8%	3
Q8PPS4	Chemotaxis protein	<i>tsr</i>	XAC0611	+	-	-	CM	72 kDa	-	0.127496	3%	2
Q8PHY1	Coenzyme PQQ synthesis protein E	<i>pqqE</i>	XAC3117	+	-	-	C	41 kDa	-	0.086603	7%	2
Q8PQH9	Degenerated cellulase	~	XAC0346	+	-	-	U	49 kDa	-	0.851668	4%	2
Q8PMM0	DNA polymerase III alpha chain	<i>dnaE1</i>	XAC1406	++	-	-	C	132 kDa	-	0.104260	10%	13
Q8PH38	Electron transfer protein azurin I	<i>az1</i>	XAC3422	++	-	-	P	16 kDa	21/22	0.925214	16%	2
Q8PMZ0	Endo-1,3-beta-glucanase	<i>lamA</i>	XAC1285	++	-	-	EC	50 kDa	34/35	0.724712	13%	2
Q8PIR2	Extracellular serine protease	-	XAC2833	+	-	-	C	62 kDa	-	0.860523	7%	2
Q8PG61	Ferrichrome-iron receptor 3	-	XAC3756	+	-	-	OM	78 kDa	30/31	0.878707	6%	2
Q8PQZ3	Ferripyoverdine receptor	<i>fpvA</i>	XAC0176	+	-	-	OM	82 kDa	42/43	0.916035	4%	2
Q8PJP4	Formate dehydrogenase a chain	-	XAC2486	+++	-	-	C	86 kDa	-	0.091921	9%	5
Q8PGT2	General secretion pathway protein D	<i>xpsD</i>	XAC3534	++	-	-	OM	79 kDa	-	0.947830	7%	2
Q8PJZ5	GGDEF family protein	-	XAC2382	+	-	-	CM	77 kDa	-	0.129804	5%	2
Q8PI22	Glucan 1,4-beta-glucosidase	-	XAC3076	+++	-	-	P	95 kDa	25/26	0.783423	5%	5
Q8PFA2	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	<i>zwf</i>	XAC4081	++	-	-	C	68 kDa	-	0.708762	6%	2
Q8PP00	Glucose-fructose oxidoreductase	<i>gfo</i>	XAC0888	++	-	-	P	42 kDa	-	0.389453	6%	2
M4GN94	Glutamine synthetase	<i>glnA</i>	-	++	-	-	C	36 kDa	-	0.523370	10%	2
Q8PPS5	Histidine kinase-response regulator hybrid protein	-	XAC0610	+++	-	-	CM	96 kDa	-	0.100540	5%	3
Número de	Descrição da proteína	Nome do	GeneID	XAM1-EX*	XAM1*	NB*	Local prot. <sup>2</sup>	Peso mol. teórico <sup>3</sup>	Peptídeo sinal <sup>4</sup>	SecP score <sup>5</sup>	Seq. cobertura	Matched dos



acesso <sup>1</sup>		gene										peptídeos
Q8PI67	Histidine kinase-response regulator hybrid protein	-	XAC3031	+	-	-	CM	130 kDa	-	0.127809	4%	2
Q8PH37	Histidinol-phosphate aminotransferase	<i>hisC</i>	XAC3423	+	-	-	U	43 kDa	23/24	0.695395	9%	2
Q8PIW4	Leucine--tRNA ligase	<i>leuS</i>	XAC2781	+	-	-	CM	99 kDa	-	0.151596	5%	2

**\*Os Os níveis de expressão das proteínas secretadas foram representados da seguinte forma: 0=(-); 0,1 a 19=(+); 20 a 39=(++); ≥ 40 =(+++).**

1: Número de acesso da proteína no UniProt Knowledgebase (UniProtKB; <http://www.uniprot.org/>);

2: Localização das proteínas predita pelo PSORTb v 3.0. Subcellular Localization Prediction Tool (<http://www.psort.org/psortb/>); C: citoplasma, ME: membrana externa, D: desconhecido, E: proteínas extracelular, MC: membrana citoplasmática, P: periplasma

3: Peso molecular teórico da proteína em kDa;

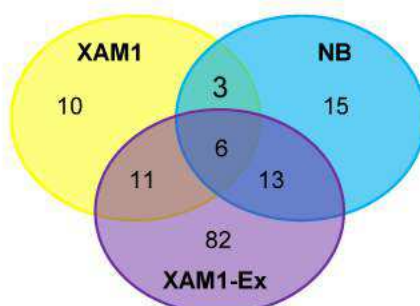
4: Posição de clivagem do peptídeo sinal predita pelo SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);

5: Predição de secreção não-clássica de proteínas pelo SecretomeP Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) utilizado para proteínas que não apresentem peptídeo sinal. Score > 0,5 indica secreção não-clássica.

A localização subcelular de cada proteína foi predita de acordo com o programa PSORTb v. 3.0.2 *Subcellular Localization Prediction Tool* (<http://www.psort.org/psortb/>), o que permitiu verificar que 61 proteínas foram descritas como citoplasmáticas, 24 foram identificadas como pertencentes à membrana citoplasmática, 15 à membrana externa, 6 ao periplasma e 5 como proteínas extracelulares. Entretanto, não foi possível determinar a localização subcelular de 29 proteínas.

Dentre estas proteínas identificadas por espectrometria de massa, 19 possuem peptídeo sinal predito pelo software SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e 121 não possuem. No entanto, estas foram confirmadas como proteínas secretadas pelo programa SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>).

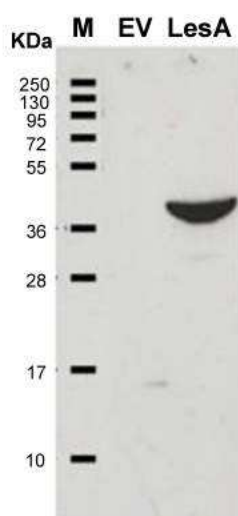
Embora tenham sido identificadas um total de 140 proteínas secretadas por Xac306<sub>wt</sub>, somando os três meios de cultura diferentes, não foi possível identificar a presença da proteína LesA. Os níveis de expressão destas proteínas secretadas diferenciou dentre os meios de cultivo (Tabela 2). Observando os dados obtidos, foi possível constatar que 15 proteínas secretadas por Xac306<sub>wt</sub> foram exclusivamente encontradas no sobrenadante do meio NB, 10 em XAM1 e 82 em XAM1-Ex. Além disso, 11 proteínas estavam presentes tanto em XAM1 como em XAM1-Ex, 3 proteínas estavam presentes em ambos os meios NB e XAM1 e 13 em NB e XAM1-Ex. Contudo, apenas 6 proteínas foram encontradas nos três meios de cultivo (Figura 9).



**Figura 10.** Distribuição das proteínas secretadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* str. 306 identificadas por LC-MSMS nas três condições de cultivo *in vitro*.

#### 4.5. Expressão da proteína LesA recombinante em células de *E. coli*, purificação e caracterização bioquímica da atividade lipásica e esterásica.

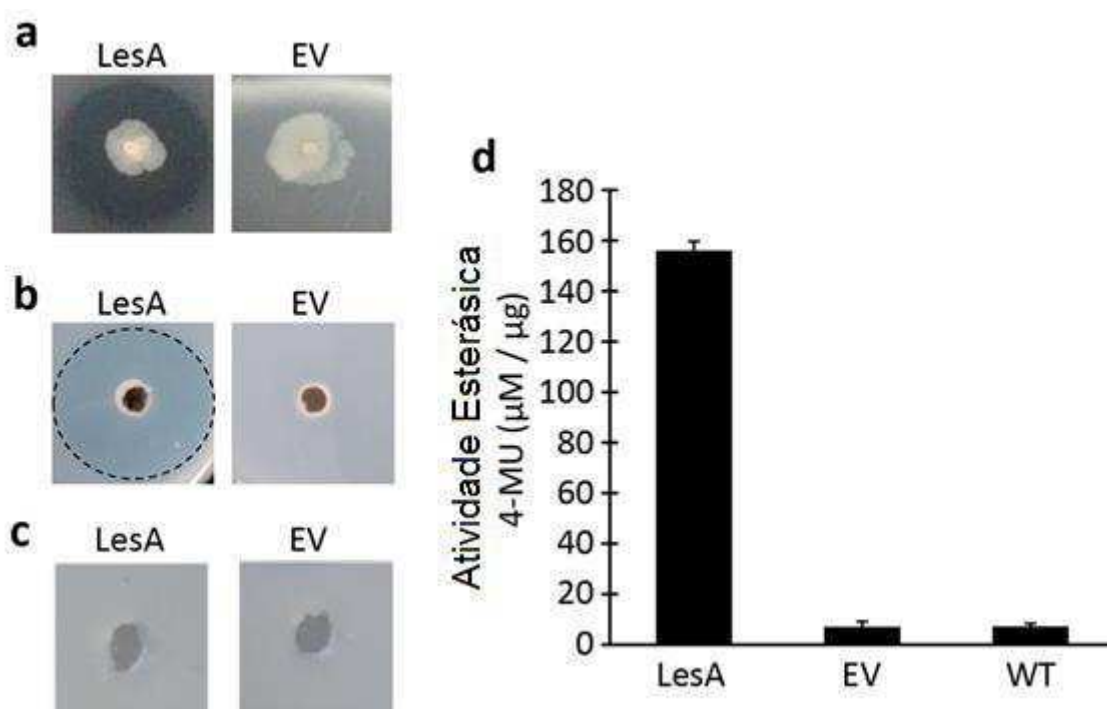
Com o objetivo de confirmar a expressão e purificação da proteína LesA, foi realizado um *Western blotting* utilizando-se um anticorpo monoclonal anti-flag marcado com peroxidase. A visualização de uma banda única e de peso molecular de 42 kDa demonstrou que a proteína LesA foi expressa e purificada corretamente (Figura 11).



**Figura 11. Detecção da proteína LesA recombinante por *Western blotting*.** Coluna M: marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa; coluna EV: extrato bruto do vetor plasmidial vazio; Coluna LesA: extrato bruto de proteína recombinante LesA.

Após confirmar a presença da proteína LesA, procedeu-se com os testes de caracterização bioquímica da atividade lipásica e esterásica da proteína (Figura 12). As colônias de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com o gene *lesA* (DH5 $\alpha$ -LesA) ou com o vetor vazio (DH5 $\alpha$ -EV) foram submetidas ao teste de atividade lipásica com a finalidade de se observar a capacidade de degradação de lipídeos de cadeia curta (Figura 12 A). As colônias de células de DH5 $\alpha$ -LesA, cultivadas em meio sólido LB com 1% de tributirina, apresentaram halo de degradação no entorno da colônia devido à hidrólise deste triacilglicerídeo de cadeia curta, ao contrário do que ocorre com as células DH5 $\alpha$ -EV, que por não apresentarem o gene codificante da proteína LesA, não foram capazes de causar a hidrólise da tributirina. Confirmando a atividade lipásica das colônias das DH5 $\alpha$ -

LesA, procedeu-se com teste da atividade lipásica do lisado destas células. Novamente foi possível confirmar a presença do halo de degradação no entorno do orifício ao qual continha o lisado de DH5 $\alpha$ -LesA (Figura 12 B). Porém, quando se testou a atividade lipásica do sobrenadante coletado do cultivo das células DH5 $\alpha$ -LesA, observou-se que não houve halo de degradação entorno dos orifícios (Figura 12C). Contudo, este resultado já é esperado uma vez que a bactéria, por estar presente em um meio rico em nutrientes, não apresentou necessidade de secretar esta proteína para o meio de cultura.



**Figura 12. *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  expressando o gene *lesA* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.** (A) Presença do halo de degradação devido à hidrólise da tributirina (C4) ao redor da colônia de *E. coli* DH5 $\alpha$  indicando a atividade lipásica da LesA sobre triacilglicerídeos de cadeia curta. (B) Atividade lipásica foi analisada através da formação do halo de degradação ao redor do orifício contendo lisado de células DH5 $\alpha$  que expressam o gene *lesA* (LesA) ou que apresentam vetor vazio (EV) em meio ágar tributirina. (C) Atividade lipásica do sobrenadante de células DH5 $\alpha$  transformadas com o gene *lesA* (LesA) ou com vetor vazio (EV) foi analisada através da presença do halo de degradação entorno do orifício presente em meio ágar tributirina. (D) Atividade esterásica das proteínas presentes no lisado de células DH5 $\alpha$  que expressam o gene *lesA* (LesA) ou que apresentam vetor vazio (EV) foi constatado através do ensaio com 4- metilumbeliferil butirato (4-MUB).

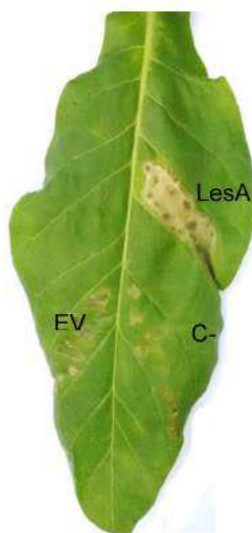
Como a proteína LesA é uma lipase/esterase e pode estar relacionada com a virulência da Xac em citros, foi realizado um ensaio para detectar a atividade esterásica dessa enzima na amostra de lisado de DH5 $\alpha$ -LesA (Figura 12 D). O



resultado do ensaio demonstra que a atividade enzimática foi maior na amostra de lisado de DH5 $\alpha$ -LesA, de valor de 156,03 [4-MU ( $\mu$ M)/proteína total (ug)], enquanto a amostra do lisado de DH5 $\alpha$ -EV obteve valor igual a 7,08 [4-MU ( $\mu$ M)/proteína total (ug)] e da amostra do lisado das células DH5 $\alpha$  não transformadas de valor igual a 7,27 [4-MU ( $\mu$ M)/proteína total (ug)]. Essa maior detecção de atividade esterásica no lisado de DH5 $\alpha$ -LesA em comparação com as amostras DH5 $\alpha$ -EV e DH5 $\alpha$  não transformadas é atribuída à presença da proteína LesA presente nas células transformadas.

#### 4.6. Ensaio de hipersensibilidade *in planta*.

Com a finalidade de o possível papel da lipase/esterase LesA na virulência de Xac306<sub>wt</sub> na doença do cancro cítrico, folhas de *Nicotiana tabacum* foram inoculadas mecanicamente com 6  $\mu$ g/ $\mu$ L de extratos proteicos LesA e EV, e controle negativo (tampão de lise) (Figura 13). O extrato proteico LesA, diferente dos controles negativos EV (extrato proteico sem LesA) e C- (tampão de lise), induziu necrose na área infiltrada em 24 horas, indicando que a LesA possa contribuir na virulência de Xac306<sub>wt</sub> em citros.



**Figura 13. Resposta de hipersensibilidade em folhas de *Nicotiana tabacum*.** Extrato proteico de LesA (LesA) ativa reação de defesa hipersensível em folha de *Nicotiana tabacum* após inoculação, levando a necrose na área infiltrada, diferente dos controles extrato proteico sem LesA (EV) e tampão de lise (C-)

## 5. Discussão

Xac é um dos fitopatógenos mais importantes na citricultura mundial, ocasionando perdas agronômicas e econômicas irreversíveis para a cultura, o que, somado com outras doenças e com o impacto do câmbio, torna oneroso o custo de produção da cultura (CONAB, 2013). Analisando a crescente incidência do cancro cítrico, a carência de cultivares resistentes à doença e a ausência de metodologias eficazes para seu controle, a tecnologia do DNA recombinante se torna uma via promissora para a elucidação e o entendimento dos mecanismos de patogenicidade em nível molecular, bem como para a identificação de efetores de virulência, sinalizadores para o início do processo de infecção, entre outros, que podem assessorar no desenvolvimento de drogas e de metodologias de controle e intervenção do cancro cítrico (NELSON & COX, 2011).

Após o sequenciamento do genoma de Xac, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de identificar genes alvos que participam ou são responsáveis pelos processos de patogenicidade da bactéria. Uma metodologia eficaz para gerar mutantes que vem sendo utilizada para um mapeamento em larga escala de potenciais genes de virulência em várias espécies de *Xanthomonas* é a mutagênese (QIAN *et al.*, 2005; LAIA *et al.*, 2009; ROTT *et al.*, 2011). Visando isso, nosso trabalho se propôs a estudar o papel da lipase/esterase LesA na virulência e patogenicidade na doença do cancro cítrico com base em que o gene XAC0501 expressa uma proteína ortóloga à enzima LipA, presente em diversas espécies do grupo das *Xanthomonas* (JHA *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2012).

No teste de patogenicidade, os sintomas produzidos pelo mutante  $\Delta$ Xac-LesA, quando inoculado mecanicamente em folhas de laranja da qualidade Valência, foram menos severos quando comparados com o da estirpe selvagem e apresentaram menor expansão dos sintomas nos locais de infiltração da suspensão celular. Aparna e colaboradores (2007) caracterizaram a LipA de *X. oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), uma proteína ortóloga a LesA, como uma enzima degradante da parede celular ao qual apresenta um domínio de ligação a carboidrato, essencial para a função de virulência proteína. Já Tamir-Ariel e colaboradores (2010) observaram que em *X. campestris* pv. *vesicatoria* a LipA é expressa na fase inicial da infecção em folhas de tomate e é um fator chave na

virulência deste fitopatógeno. Portanto, esta sintomatologia reduzida observada no mutante  $\Delta$ Xac-LesA se deve, provavelmente, à dificuldade do mutante em degradar a parede celular de seu hospedeiro na fase inicial da infecção devido à ausência da LesA como fator de virulência, ao qual seria importante na patogenicidade deste microrganismo. Nascimento e colaboradores (2016) também relataram este comportamento em folhas de videira ao inocularem mecanicamente mutantes para a LesA (PD1703) de *X. fastidiosa*. Em seu trabalho, Nascimento confirmou, através da análise do secretoma, que a lipase/esterase LesA de *X. fastidiosa* é uma das seis proteínas mais abundantes secretadas e é parcialmente responsável pelos sintomas na doença de Pierce. Contudo, quando procedemos com o secretoma *in planta* visando constatar a presença de LesA em folhas inoculadas com a cepa selvagem de Xac não conseguimos identificar sua presença.

Constatamos no secretoma *in planta* a presença de 959 proteínas, porém, deste total, apenas 20 foram identificadas como proteínas relacionadas ao fitopatógeno em estudo, sendo destas, sete proteínas hipotéticas. Estas proteínas hipotéticas representam as proteínas cujas funções ainda não são conhecidas mas que estão presentes em vários organismos (proteínas hipotéticas conservadas) (SOUSA, 2010). Apesar disso, não foi possível identificar a proteína LesA no secretoma, especulamos que devido a pequena quantidade de proteínas encontradas de Xac, deve ter ocorrido algum problema na técnica referente a extração das proteínas ou as concentrações presentes nas amostras eram tão baixas que não foi possível identificá-las.

Todavia, foi possível identificar proteínas relacionadas a virulência e patogenicidade, tal como o gene que codifica um fator regulador de virulência (XACLG97\_7600007). Alguns estudos tem sugerido que este fator regulador de virulência pode estar envolvido em processos de replicação, recombinação e transposição. Vários trabalhos tem demonstrado a importância de reguladores de virulência, como o XrvA e XrvB, na patogenicidade de diversas bactérias, por exemplo em *Escherichia coli*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae*, *X. fastidiosa* e *X. oryzae* pv. *oryzae* (TENDENG & BERTIN, 2003; DORMAN, 2004; FANG & RIMSKY, 2008; FENG *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2010; KAMETANI-IKAWA *et al.*,

2011). USSERY e colaboradores (1994), relataram em seu trabalho que mutantes de Xac para este gene, apresentaram ausência de encharcamento, leve hiperplasia e ausência de necrose, comprovando ser uma proteína importante na virulência deste microrganismo.

Outro grupo de proteínas presente no secretoma *in planta* com capacidade de degradar a parede celular são as hidrolases [metaloproteinase (XACG102\_1100002) e a hidrolase (XACG102\_2150004)], estas proteínas estão relacionadas a nutrição, pois através da degradação libera carboidratos necessários para o crescimento da bactérias, e também contribuem com a patogenicidade bacteriana, pois apresentam um papel importante na motilidade (SILVA, 2004). Constatamos também a presença de uma proteína relacionada a motilidade do microrganismo, a proteína flagelar FliJ (XAC3610\_5300008), no secretoma *in planta*. Os flagelos bacterianos são estruturas complexas onde vários genes estão envolvidos em sua síntese (MACNAB, 1992). Este fato pode ser observado, por exemplo, no sistema flagelar de *Salmonella typhimurium* ao qual requer pelo menos 40 genes (JONES & MACNAB, 1990). A motilidade é um fator determinante para a colonização, adesão e invasão, além de serem empregadas na secreção de proteínas de virulência, bem como na quimiotaxia (GUERRY, 2007).

Já que não foi possível identificar a LesA no secretoma *in planta*, realizamos o secretoma da cepa selvagem de Xac em três condições diferentes de meio de cultura, XAM1 e XAM1 com 30% de extrato foliar (XAM1-Ex), que são meios indutores de virulência, e em meio de cultura rico não indutor NB. Analisando os resultados do secretoma *in vitro* de Xac, também não foi possível identificar a presença da proteína LesA em nenhuma das condições de cultivo. A ausência da LesA no secretoma nos leva a suspeitar de que os meios de cultura que induzem a virulência não foram capazes de ativar a expressão do gene *lesA*, e devido a este motivo a espectrometria de massa não foi capaz de identificar. Porém, outras proteínas ortólogas a LesA já foram detectadas em secretomas de outros fitopatógenos, como no trabalho de Nascimento e colaboradores (2016) onde a lipase/esterase LesA de *X. fastidiosa* é umas das seis proteínas mais abundantes secretadas. Contudo, obtivemos um total de 140 proteínas secretadas



identificadas, destas se procedeu com uma análise comparativa, afim de identificar outros potenciais fatores de virulência secretados.

Dentre as 140 proteínas secretadas listadas, apenas 6 são expressas nas três condições de cultura. Estas proteínas em sua maioria estão relacionadas ao metabolismo de macromoléculas e a processos celulares. Todavia, dentro desse se encontra uma enzima relacionada a adaptação e a virulência de Xac, a catalase katE (XAC1211), uma enzima intracelular, capaz de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ). Apesar de se encontrar nos três meios de cultivo, está mais presente nos meios de cultura indutores de virulência. Este fato é observado porque os meios de cultura XAM1 e XAM1-Ex mimetizam o contato inicial da bactéria com a planta hospedeira, onde umas das primeiras respostas da planta ao patógeno reconhecido é a explosão oxidativa, que consiste na rápida geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esta enzima é importante na virulência, pois está, em partes, relacionada com a capacidade da bactéria fitopatogênica em se multiplicar nos tecidos da planta hospedeira, devido a ação enzimática de desintoxicação de  $H_2O_2$ . Tondo e colaboradores (2010) descreveram em seu trabalho que, esta enzima katE é dificilmente detectável no início e em meados das fases de infecção, porém quando a bactéria Xac atinge a fase exponencial de crescimento, sua expressão aumenta podendo a chegar a níveis de expressão 5 vezes mais altos durante a fase estacionária da infecção.

As 10 proteínas secretadas encontradas exclusivamente no meio XAM e as 3 em ambos os meios XAM1 e NB, são classificadas, em sua maioria, como proteínas relacionadas biossíntese de pequenas moléculas, aos processos celulares e ao metabolismo de macromoléculas e intermediário. Porém, uma protease foi identificada em ambos os meios XAM1 e NB, com quase o mesmo nível de expressão, a dipeptidil peptidase IV (XAC4046). A dipeptidil peptidase (DPP4) é uma serino-protease ao qual cliva preferencialmente peptídeos contendo dois resíduos de alanina ou prolina subsequentes, portanto, está envolvida na degradação de peptídeos como uma fonte de nutriente para o fitopatógeno (LAMBEIR *et al.*, 2003). Várias espécies de bactérias, tais como *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus thermophilus*,

*Porphyromonas gingivalis*, e *Prevotella albensis*, já foram descritas como capazes de produzir DPP4 (VESANTO *et al.*, 1995; TSAKALIDOU *et al.*, 1997; KUMAGAI *et al.*, 2000; GOLDSTEIN *et al.*, 2001; WALKER *et al.*, 2003). Apesar disso, ainda existe uma escassez de informações sobre as funções patológicas da DPP4 bacteriana (KUMAGAI *et al.*, 2000).

Em ambos os meios de cultura XAM1-Ex e XAM1 detectamos 11 proteínas, contudo, dentre estas secretadas não foi possível identificar nenhuma relevante relacionada a virulência e patogenicidade do fitopatógeno Xac. Todavia, no meio de cultura XAM1-Ex encontramos um total de 82 proteínas exclusivas, e dentro deste grupo, várias proteínas importantes para o microrganismo desencadear a doença.

Supõe-se que a degradação dos componentes da parede celular vegetal por enzimas bacterianas facilita a aquisição de nutrientes, assim como a translocação de fatores de virulência para a célula hospedeira. As enzimas relacionadas com a degradação da parede celular e que contribuem com a virulência de Xac ao qual estão presentes no meio de cultura XAM1-Ex são as xilanases  $\alpha$ -xilosidase (XAC1773) e  $\beta$ -xilanase (XAC4249); poligalacturonases (XAC2374); proteases como a Alanil dipeptidil peptidase (XAC1204), serino-protease (XAC2833), carboxipeptidase (XAC1713), peptidase (XAC4004) e

Metaloproteinase (XAC0465); celulases como a codificada pelo gene XAC0346 e a Endo-1,3-beta-glucanase (XAC1285) e glucosidase (XAC3076).

Vários trabalhos vem demonstrando a importância destas proteínas relacionadas a degradação da parede celular, por exemplo, o trabalho de Sun e colaboradores (2005) construíram quatro mutantes defectivos no gene *xpsE* de *X. oryzae* pv. *oryzae*, e constataram a ausência de secreção de enzimas extracelulares como as xilanases e celulases no espaço extracelular pelos mutantes, isso ocasionou perda ou diminuição da virulência desta estirpe quando em confronto com seu hospedeiro, o arroz.

Estudos anteriores têm documentado as funções de virulência de poligalacturonases (PG) em espécies *Erwinia*, *Ralstonia* e *Xanthomonas* (NASCER *et al.*, 1999; HUGOUIEUX-COTTE-PATTAT *et al.*, 2002; VALLS *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2008). Porém, Wang e colaboradores (2008) realizaram alinhamentos das sequências de aminoácidos de todas as PG a partir dos três

fitopatógenos *Erwinia* spp., *Ralstonia solanacearum* e *X. campestris* pv. *campestris*, e eles observaram uma baixa homologia, indicando que estas proteínas não são conservadas entre os diferentes fitopatógenos. No entanto, dentro as espécies de *Xanthomonas*, as PG são relativamente conservadas. Mutantes de *X. campestris* pv. *campestris* para as PG genes pghAxc e pghBxc demonstraram ser menos virulentos, confirmando assim a importância desta proteína para este fitopatógeno (WANG *et al.*, 2008).

O papel das proteases identificadas no secretoma de Xac em meio XAM1-Ex, assim como a de outras bactérias causadoras de fitopatologias, pode ser simplesmente nutricional, embora seja possível que a proteólise de proteínas estruturais, como a da parede celular vegetal, permita a propagação dos microrganismos ou auxilie a superar alguma reação de defesa do hospedeiro (DOW *et al.*, 1990). Estudos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos para caracterizar e determinar a função das proteases no desenvolvimento de doenças, como por exemplo, Dow e colaboradores (1990) realizaram ensaios com mutantes para proteases extracelulares de *X. campestris* pv. *campestris* e constataram que sua virulência foi reduzida. Em outro estudo, Zou e colaboradores (2012) constataram que mutantes *X. oryzae* pv. *oryzicola* para a protease EcpA apresentam redução na virulência quando inoculadas em arroz, confirmando assim a importância destas proteínas na patogênese deste microrganismo.

As celulasas (E.C:3.2.1.4) expressas por Xac em meio XAM1-Ex corrobora com os dados da literatura, pois essa fitobactéria inicialmente se encontra em locais nutricionalmente pobres, por esse motivo, a Xac pode se utilizar da degradação da parede do hospedeiro para a obtenção de nutrientes como polissacarídeos, açúcares, lipídios, aminoácidos e tantos outros mais (FACINCANI, 2007). Contudo, assim como as proteases, há trabalhos que demonstram que a ausência destas proteínas reduz a capacidade de virulência de fitopatógenos (KERPPOLA *et al.*, 1987; HU *et al.*, 2007; XIA *et al.*, 2016).

Depois de analisar o perfil proteico do secretoma da cepa selvagem de Xac em três condições diferentes de meio de cultura, realizou-se ensaios bioquímicos para comparar os níveis de expressão das proteínas secretadas de característica lipase/esterase. Para o teste de atividade lipásica o uso de meio de cultura sólido suplementado com emulsionados de triglicérides é uma metodologia

padrão para a avaliação qualitativa de microrganismos produtores de lipase. O método consiste em obter um halo diferenciado ao redor da colônia do microrganismo, por meio da atuação das enzimas secretadas sobre as substâncias diferenciadas que foram adicionadas ao meio, como a tributirina (CARDENAS *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2004). A diferença de intensidade entre os halos se deve à quantidade de lipases extracelulares secretada pelo patógeno (CARDENAS *et al.*, 2001).

Para a caracterização da atividade lipásica, as colônias de Xac foram crescidas nos meios sólidos indutores de virulência XAM1, XAM1-Ex e no não indutor NB emulsificados com 1% de tributirina. Se observou o desenvolvimento das colônias de Xac cultivadas nos meios indutores eram bem reduzido se comparado com as do meio NB, porém a quantidade de proteínas secretadas capazes de hidrolisar a tributirina era muito mais significativa. Isso ocorre por que os meios indutores são meios de cultura pobres em nutrientes. O meio de cultura pobre é um sinal para o metabolismo da célula para reorganização para estocagem de energia, assim o microrganismo reduz a sua taxa de replicação e passa a sintetizar mais moléculas que contribuam para a sua permanência no meio ao qual se encontra. Os meios indutores XAM1 e XAM1-Ex mimetizam as condições encontradas na planta hospedeira, induzindo a síntese de genes ligados aos sistemas de secreção (WENGELNIK *et al.*, 1996).

Logo após o ensaio para determinar a atividade lipásica das colônias crescidas nos meio XAM1, XAM1-Ex e NB emulsificados com 1% de tributirina, se prosseguiu com o ensaio para detectar a atividade esterásica do lisado de Xac crescidas nesses meio líquidos. O lisado de Xac no meio XAM1-Ex foi o que apresentou maior atividade lipásica, porém, acreditamos que a maioria desta atividade esteja relacionada as proteínas provenientes do extrato das folhas de citros acrescentados no meio. Isso se dá devido aos resultados analisados no secretoma e observando o resultado da atividade esterásico do lisado de Xac no meio de cultura XAM1, que foi menor que a atividade esterásica encontrado no lisado de Xac meio NB. Portanto, supomos que o meio de cultura XAM1 possa não ser um meio indicado a expressão da proteína LesA.

Dando sequência aos experimentos, após a caracterização dos secretomas de Xac, procedemos com testes de caracterização bioquímica com as cepas de

Xac306<sub>wt</sub> e  $\Delta$ Xac-LesA afim comparar os níveis de expressão das proteínas secretadas de característica lipase/esterase. Nos resultados do ensaio da atividade lipásica, constatamos que as colônias de  $\Delta$ Xac-LesA crescidas em meio sólido NB com 1% tributirina apresentaram menor halo lipolítico comparado ao formado entorno das colônias de Xac306<sub>wt</sub>. Esta redução na capacidade de hidrolise da tributirina pelo mutante pode ser devido a deficiência na expressão da proteína LesA, que por sua vez é capaz de hidrolisar lipídeos de cadeia curta como a tributirina (C4). Como a proteína LesA é uma lipase/esterase e pode estar relacionada com a virulência da Xac em citros, foi realizado um ensaio para detectar a atividade esterásica dessa enzima nas amostras de lisado de  $\Delta$ Xac-LesA e Xac306<sub>wt</sub>. Utilizou-se como substrato o 4-MUB (4-metilumbeliferil butirato) que, quando hidrolisado por uma lipase/esterase, forma uma molécula altamente fluorescente, a 4-metilumbeliferil (4-MU) e ácido butírico (VANEECHOUTTE *et al.*, 1988). O resultado do ensaio demonstra que a atividade enzimática foi 4,5 vezes maior na amostra de Xac306<sub>wt</sub> do que na de  $\Delta$ Xac-LesA. Essa maior detecção de atividade esterásica na cepa selvagem em comparação com a mutante pode ser atribuída à presença da proteína LesA no lisado das culturas.

A lipase/esterase LesA de Xac, codificada pelo gene XAC0501, é uma proteína ortóloga à enzima LipA, presente em diversas espécies do grupo das *Xanthomonas*. Visto isso, após se proceder com a caracterização funcional e bioquímica das colônias e  $\Delta$ Xac-LesA e Xac306<sub>wt</sub>, células de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas (DH5 $\alpha$ -LesA) com o gene *lesA* afim de expressar a proteína LesA recombinante para seguir com os testes bioquímicos que confirmem a sua atividade lipase/esterase.

Para a caracterização da atividade lipásica foram realizados experimentos para comprovar a capacidade de degradar lipídeos de cadeia curta da LesA. No primeiro ensaio, crescemos colônias de DH5 $\alpha$ -LesA e *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas com vetor vazio (DH5 $\alpha$ -EV) em meio LB sólido com 1% de tributirina, e pode-se observar a presença do halo de degradação somente ao redor da colônia de DH5 $\alpha$ -LesA. Este resultado indica que as células transformadas com o gene *lesA* estariam se utilizando da expressão e secreção desta proteína para degradar o triglicérides presente no meio, diferente da colônia de DH5 $\alpha$ -EV, que por não apresentar o gene *lesA*, não foi capaz de hidrolisar a tributirina presente no

meio de cultura. Outros dois ensaios foram realizados para caracterizar a atividade lipolítica da LesA, onde em um se utilizou o lisado de DH5 $\alpha$ -LesA e DH5 $\alpha$ -EV e no outro sobrenadante destas células cultivadas em meio LB. Em ambos os experimentos as amostras foram adicionadas em orifícios feitos em meio ágar tributirina. No orifício contendo o lisado de DH5 $\alpha$ -LesA foi possível constatar a presença do halo de degradação ao seu redor, ao contrário do que se observou no lisado de DH5 $\alpha$ -EV, o que já era esperado. Interessantemente, nos sobrenadantes não foi possível notar em nenhuma das amostras o halo de hidrólise da tributirina, o que nos leva a crer que em condições de meio de cultivo normais as células de DH5 $\alpha$ -LesA não secretam a LesA. Esta característica é bem quista uma vez que elimina as etapas de concentrações proteicas do sobrenadante.

A análise comparativa da atividade esterásica das proteínas presentes no extrato bruto DH5 $\alpha$ -LesA, de DH5 $\alpha$ -EV e células de *E. coli* DH5 $\alpha$  não transformadas foi constatado através do ensaio com 4-metilumbeliferil butirato (4-MUB). O ensaio demonstrou que a atividade enzimática foi aproximadamente 8 vezes maior na amostra DH5 $\alpha$ -LesA, relacionado a atividade nas amostras de DH5 $\alpha$ -EV e células de *E. coli* DH5 $\alpha$  não transformadas. Essa maior detecção da atividade esterásica pode ser atribuída à presença da proteína LesA presente no extrato bruto de DH5 $\alpha$ -LesA.

Dentre as defesas utilizadas pelas plantas estão a resposta hipersensitiva (HR). A HR ou reação de hipersensibilidade em plantas é um dos principais eventos da resposta de defesa da planta frente a infecção por fitopatógenos, se caracterizando por ser uma resposta rápida e localizada, ou seja, que ocorre no sítio de infecção do patógeno (FERNANDES *et al.*, 2009). Várias proteínas já foram relatadas como ativadoras da HR e importantes na virulência dos seus respectivos patógenos, tais como a LesA de *X. fastidiosa*, LipA de *X. oryzae* pv. *oryzae* e a de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (APARNA *et al.*, 2009; TAMIR-ARIEL *et al.*, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2016). Considerando estes dados encontrados na literatura e objetivando constatar a importância da lipase/esterase LesA na virulência de Xac306<sub>wt</sub> na doença do cancro cítrico, folhas de *Nicotiana tabacum* foram inoculadas com o extrato bruto de LesA. O extrato proteico LesA, diferente dos controles, induziu necrose na área infiltrada, indicando que a LesA possa

contribuir na virulência de Xac306<sub>wt</sub> em citros. Nascimento e colaboradores (2012) também observaram que a LesA de *X. fastidiosa* era capaz de causar uma reação de hipersensibilidade em folhas de videiras, e que na ausência desta proteína a virulência deste fitopatógeno era reduzido. Este fato também foi observado neste trabalho, uma vez que os mutantes de Xac para o gene *lesA* apresentaram capacidade de virulência limitado quando comparado com a cepa selvagem.

## 6. Conclusões

O presente estudo permite concluir que:

- A proteína LesA está envolvida na patogênese de Xac na doença do cancro cítrico, uma vez que os mutantes para gene *lesA* apresentaram uma virulência reduzida quando comparado com a cepa selvagem;
- As análises dos secretomas aqui apresentados oferecem novos *insights* sobre a patobiologia deste patógeno e permitiu a identificação de uma série de possíveis fatores de virulência que podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento do cancro cítrico;
- A caracterização bioquímica da LesA recombinante, expressa em *E. coli* DH5 $\alpha$ , confirmou a atividade lipolítica e esterásica desta enzima;
- Ocorreu a ativação da reação de hipersensibilidade em folhas de *Nicotiana tabacum* ao se inocular o extrato bruto de LesA, causando necrose no local onde ocorreu a infiltração.



## 7. Referências

- AMARAL, A. M. Cancro cítrico: permanente preocupação da citricultura no Brasil e no mundo. Brasília: Embrapa, 2003.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 18, n. 3-4, p. 353-357, 1997.
- ANTELMANN, H.; TJALSMA, H.; VOIGT, B.; OHLMEIER, S.; BRON, S.; DIJL, J. M. V.; HECKER, M. A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. *Genome Research*, v.11, n.9, p.1484-1502, 2001.
- APARNA, G.; CHATTERJEE, A.; SONTI, R. V.; SANKARANARAYANAN, R. A cell walldegrading esterase of *Xanthomonas oryzae* requires a unique substrate recognition module for pathogenesis on rice. *The Plant Cell*, v.21, n.6, p.1860-1873, 2009.
- ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochemical Journal*. v. 343, p.177-183, 1999.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CITRICULTORES (ASSOCITRUS). Cancro cítrico: Legislação deve atender realidade do campo. Disponível em: <http://www.associtrus.com.br>>. Acesso em 12 de março de 2016.
- BAPTISTA, J. C. Análise funcional de genes de degradação de celulose de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. 93f. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- BAPTISTELLA, C. S. L.; VICENTE, M. C. M.; FAGUNDES, P. R. S.; AMARO, A. A. 2012: Difícil Ano Para a Laranja. Instituto de Economia Agrícola. Análises e Indicadores do Agronegócio. v. 7, n.12, 2012.
- BEDENDO, I. Manchas Foliare. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.). Manual de Fitopatologia. Vol. 1. Doenças das Plantas Cultivadas. 3ª. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 848-858, 1995.
- BITANCOURT, A.A. O cancro cítrico. *O Biológico*. v.23, p.101-111, 1957.
- BRADBURY, J. F. Guide to plant Pathogenic Bacteria. Slough: C. A. B. International, p. 332, 1993.
- BRUNINGS, A. M.; GABRIEL, D. W. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular plant pathology*, Florida, v.4, p. 141-157, 2003.
- BRZOZWSKI, A. M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z. S. DODSON, G. G.; LAWSON, D. A model for interfacial activation in lipase from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*. v. 351, p. 491-494. 1991.
- BUTTNER, D.; BONAS, U. Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *European molecular biology organization*, v. 21, p.5313–5322, 2002.
- CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in

organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdã, v. 14, p. 111-123, 2001.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. Laranja, safra 2013/2014. Terceiro Levantamento - São Paulo e Triângulo Mineiro. Brasília, DF, p. 1-11, dez. 2013.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira, Laranja safra 2011/2012. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11\\_09\\_12\\_17\\_44\\_13\\_arquivo\\_edit\\_avel\\_capa\\_laranja..pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_09_12_17_44_13_arquivo_edit_avel_capa_laranja..pdf)>. Acesso em 12 março de 2016.

CHO, Y.; DAVIS, J. W.; KIM, K. H.; WANG, J.; SUN, Q. H.; CRAMER Jr., R. A.; 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.

DA SILVA, A. C. R.; FERRO, J. A.; REINACH, F. C.; FARAH, C. S.; FURLAN, L. R.; QUAGGIO, R. B.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. A.; ALMEIDA, N. F.; ALVES, L. M. C.; DO AMARAL, A. M.; BERTOLINI, M. C.; CAMARGO, L. E. A.; CAMAROTTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CLAPINA, L. P.; CICARELLI, R. M. B.; COUTINHO, L. L.; CURSINO-SANTOS, J. R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J. B.; FERREIRA, A. J. S.; FERREIRA, R. C. C.; FERRO, M. I. T.; FORMIGHIERI, E. F.; FRANCO, M. C.; GREGGIO, C. C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A. M.; KISHI, L. T.; LEITE, R. P.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F.; LOCALI, E. C.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M. B. N.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; MARTINS, E. C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C. F. M.; MIYAKI, C. Y.; MOON, D. H.; MOREIRA, L. M.; NOVO, M. T. M.; OKURA, V. K.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; PEREIRA, H. A.; ROSSI, A.; SENA, J. A. D.; SILVA, C.; DE SOUZA, R. F.; SPINOLA, L. A. F.; TAKITA, M. A.; TAMURA, R. E.; TEIXEIRA, E. C.; TEZZA, R. I. D.; DOS SANTOS, M. T.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; WHITE, F. F.; SETUBAL, J. C.; KITAJIMA, J. P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*, Londres, v.417, p. 459–463, 2002.

DAVIDSEN, T.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; LIU, J.; YUAN, Q.; KHOURI, H.; FEDOROVA, N.; TRAN, B.; RUSSELL, D.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; VAN AKEN, S. E.; FELDBLYUM, T. V.; D'ASCENZO, M.; DENG, W. L.; RAMOS, A. R.; ALFANO, J. R.; CARTINHO, S.; CHATTERJEE, A. K.; DELANEY, T. P.; LAZAROWITZ, S. G.; MARTIN, G. B.; SCHNEIDER, D. J.; TANG, X.; BENDER, C. L.; WHITE, O.; FRASER, C. M.; COLLMER, A. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of América*, 100, 10181-10186, 2003.

DEREWENDA, U.; BRZOZOWSKI, A. M.; LAWSON, D. M.; DEREWENDA, Z. S. Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. *Biochemistry*. v. 31, p. 1532-1547. 1992.

DORMAN, C. J. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Reviews Microbiology*, v.2, p.391–400, 2004.

DOW, J. M.; CLARKE, B. R.; MILLIGAN, D. E.; TANG, J. L.; DANIELS, M. J. Extracellular proteases from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the black rot pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.2994–2998, 1990.

ENZYME NOMENCLATURE. Hydrolase: Acting on ester bonds. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html>> Acesso em: 26 de abril de 2016.

FACINCANI, A. P. Análise proteômica do fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Jaboticabal, 2007. 153p. Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

FANG, F. C.; RIMSKY, S. New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Current Opinion in Microbiology*, v.11, p.113–120, 2008.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. In: FAOSTAT. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>>. Acesso em 11 de fevereiro de 2016.

FAULKNER, C.; ROBATZEK, S. Plants and pathogens: putting infection strategies and defence mechanisms on the map. *Current Opinion in Plant Biology*, v.15, p.699 –707, 2012.

FERNANDES, C.F.; VIEIRA JUNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G.; REIS, N. D.; ANTUNES JUNIOR, H. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2009

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. Na overview of the road map to the manual. *Systematic Bacteriology*. ed. 2, New York: Springer, p. 20, 2000.

GHOSH, P. Process of Protein Transport by the Type III Secretion System. *Microbiology and molecular biology reviews*, California, v. 68, n. 4, p. 771-795, 2004.

GOLDSTEIN, J. M.; BANBULA, A.; KORDULA, T.; MAYO, J. A.; TRAVIS, J. Novel extracellular x-prolyl dipeptidyl-peptidase (DPP) from *Streptococcus gordonii* FSS2: an emerging subfamily of viridans streptococcal x-prolyl DPPs. *Infection and Immunity*. v.69, n.9, p. 5494–5501, 2001.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B. S.; GAROFALO, C. G.; ORELLANO, E. G.; OTTADO, J. A Filamentous Hemagglutinin-Like Protein of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the Phytopathogen Responsible for Citrus Canker, Is Involved in Bacterial Virulence. *Public library of science (PLoS) One*, Rosario, v. 4, n. 2, e. 4358, p. 1-13, 2009.

GOTO, M. Citrus canker. In: Kumar, J. et al. (Ed.). *Plant disease of international importance*. Englewood Cliff: Prentice-Hall. pp. 250-269, 1992.

GOTTWALD, T.R.; HUGHES, G.; GRAHAN, J. H.; SUN, X.; RILEY, T. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species. *Phytopathology* 91:30–34, 2001.

GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L. W. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Tropical Agriculture*, London, 72:194-201, 1995.

GUERRY, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. Review. Trends in Microbiology, v.15, n.10, 2007.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Biochemistry and Biotechnology, Washington, v. 34, p. 762-781, 2004.

HASSE, G. A. Laranja no Brasil 1500. Duprat & Iobe Propaganda, São Paulo, 1987.

HENDERSON, I. R.; NAVARRO-GARCIA, F.; DESVAUX, M.; FERNANDEZ, R. C.; ALA'ALDEEN, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, v.68, n.4, p.692-744, 2004.

HU, J.; QIAN, W.; HE, C. The *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* eglXoB endoglucanase gene is required for virulence to rice. FEMS Microbiology Letters, v.269, p.273–279, 2007.

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; SHEVCHIK, E. V.; NASSER, W. PehN, a polygalacturonase homologue with a low hydrolase activity, is coregulated with the other *Erwinia chrysanthemi* polygalacturonases. Journal of Bacteriology. v.184, p.2664-2673, 2002.

IBGE - Instituto Brasileiro de geografia e Estatística. Indicadores IBGE, Estatística da Produção Agrícola (2016). Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201601.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201601.pdf)>. Acesso em 11 de fevereiro de 2016.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structure, and biotechnological applications of lipases. Annual Review of Microbiology. v. 53. p. 315-351. 1999.

JENSEN, R. G. Detection and determination of lipase (acylglycerol hidrolase) activity from various sources. Lipids. v.18, p.650-657. 1983.

JHA G.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, v.18, n.9, p.891-898, 2005.

JHA, G.; RAJESHWARI, R.; SONTI, R. V. Functional interplay between two *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* secretion systems in modulating virulence on rice. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, v.20, n.1, p.31-40, 2007.

JONES, C. J.; MACNAB, R. M. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: Analysis with temperature-sensitive mutants. Journal of Bacteriology. v.172, p.1327-1339, 1990.

JUNGBLUT, P. R.; SCHAIBLE, U. E.; MOLLENKOPF, H. J.; ZIMNY-ARNDT, U.; RAUPACH, B.; MATTOW, J.; HALADA, P.; LAMER, S.; HAGENS, K.; KAUFMANN, S. H. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. Molecular Microbiology, v. 33, p.1103– 1117, 1999.

KAMETANI-IKAWA, Y.; TSUGE, S.; FURUTANI, A.; OCHIAI, H. An H-NS-like protein involved in the negative regulation of hrp genes in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. FEMS Microbiology Letters, v.319, n.1, p.58-64, 2011.

KAZEMI-POUR, N., CONDEMIN, G., HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. The secretome of the plant pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Proteomics*, v.4, n.10, p.3177-86, 2004.

KERPPOLA, T. K.; SERWOLD-DAVIS, T.; GROSS, D. C.; KAHN, M. L. Effect of Increased, B-Glucosidase Activity on Virulence of *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.4, p.677-682, 1987.

KOLLER, O. L.; SOPRANO, E.; BONAS, U. Normas técnicas para a cultura de citros em Santa Catarina. Santa Catarina: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina S.A - EPAGRI, 1993.

KOROTKOV, K. V.; SANDKVIST, M.; HOL, W. G. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, v.10, n.5, p.336-351, 2012.

KUMAGAI, Y., K.; KONISHI, T.; GOMI, H.; YAGISHITA, A.; YAJIMA, YOSHIKAWA, M. Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. *Infection and Immunity*. v.68, n.2, p.716–724, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.

LAMBEIR, A. M.; DURINX, C.; SCHARPÉ, S.; DE MEESTER, I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v.40, n.3, p.209-294, 2003.

LEE, B. M.; PARK, Y. J.; PARK, D. S.; KANG, H. W.; KIM, J. G.; SONG, E. S.; PARK, I. C.; YOON, Y. H.; HAHN, J. H.; KOO, B. S.; LEE, G. B.; KIM, H.; PARL H. S.; YOON, K. O.; KIM, J. H.; JUNG, C. H.; KOH, N. H.; SEO, J. S.; GO, S. J. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. *Nuclei Acids Research*, 33, 577-586, 2005.

LEI, B., S. MACKIE, S. LUKOMSKI, and J. M. MUSSER. Identification and immunogenicity of group A *Streptococcus* culture supernatant proteins. *Infection and Immunity*, v.68, p.6807–6818, 2000.

LEITE JUNIOR, R.P. Cancro Cítrico; prevenção e controle no Paraná. IAPAR, Circular Técnica, v.61, p.51, 1990.

LEYNS, F. DE CLEENE, M.; SWINGS, J.; DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botanical Review*, New York, v. 50, n. 3, p. 308-356, 1984.

MACNAB, R. M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annual Review of Genetics*, v.26, p.131-158, 1992.

NASSER, W.; SHEVCHIK, E. V.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. Analysis of three clustered polygalacturonase genes in *Erwinia chrysanthemi* 3937 revealed an anti-repressor function for the PecS regulator. *Molecular Microbiology*, v.34, p.641-650, 1999.

NASCIMENTO, R. Caracterização funcional de uma lipase/esterase secretada por *Xylella fastidiosa* como fator de virulência chave na patogênese da doença de Pierce. 2012.

136p. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

NASCIMENTO, R.; GOURAN, H.; CHAKRABORTY, S.; GILLESPIE, H. W.; ALMEIDA-SOUZA, H. O.; TU, A.; RAO, B. J.; FELDSTEIN, P. A.; BRUENING, G.; GOULART, L. R.; DANDEKAR, A. M. The Type II Secreted Lipase/Esterase LesA is a Key Virulence Factor Required for *Xylella fastidiosa* Pathogenesis in Grapevines. Scientific Reports. Article number: 18598, doi:10.1038/srep18598, 2016.

NELSON, D. L. & COX, M. M. Lehninger: Princípios de Bioquímica. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 2011.

NOCE, R. & MOTA, J. H. Dinâmica da Produção de Laranja na Década de 1990. Laranja. v.25, n.1, p.37-44, Cordeirópolis, 2004.

OLLIS, D. L.; SHEA, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. Protein Engineering Design and Selection. v. 5, p.197-211. 1992.

PUKATZKI, S.; MA, A.T.; STURTEVANT, D.; KRASTINS, B.; SARRACINO, D.; NELSON, W.C.; HEIDELBERG, J.F. & MEKALANOS, J.J. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.103, p.1528-33, 2006.

RAY, S. 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: MPMI, v.13, n.4, p.394-401, 2000.

RAJESHWARI, R.; JHA, G.; SONTI, R. V. Role of an in planta-expressed xylanase of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in promoting virulence on rice. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, v.18, n.8, p.830-837, 2005.

RODRIGUES NETO, J.; RIBEIRO, J. G. B. Manual técnico de procedimentos do cancro cítrico. Brasília: MAPA/SDA/ DDIV, p.66, 2002.

ROSENKRANDS, I., K. WELDINGH, S. JACOBSEN, C. V. HANSEN, W. FLORIO, I. GIANETRI, and P. ANDERSEN. Mapping and identification of Mycobacterium tuberculosis proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. Electrophoresis, v.21, p.935–948, 2000.

SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULTK, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J. C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBET, C.; SAURIN, W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THEBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBACH, J.; BOUCHER, C. A. Genome sequence of the plant pathogen *Rastonia solanacearum*. Nature, 415, 497-502, 2002.

SCHAAD, N. W.; POSTNIKOVA, E.; LACY, G.; SECHLER, A.; AGARKOVA, I.; STROMBERG, V.K.; VIDAVER, A. K. Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v. 29, p.690-695, 2006.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses, v.48, n.6, p.365-377, 2005.

SHI, X.; BI, J.; MORSE, J. G.; TOSCANO, N. C.; COOKSEY, D. A. Differential expression of genes of *Xylella fastidiosa* in xylem fluid of citrus and grapevine. FEMS Microbiology Letters, v.304, p.82–88, 2010.

SCHUSTER, A. M.; DAVES, E. Ribonucleic Acid and protein metabolism in pea epicotyls: I. The aging process. Plant Physiology, v. 73, n.3, p. 809-816, 1983.

SILVA, D. S. D. Análise dos proteomas extracelulares e do acúmulo de moléculas sinais durante o crescimento da *Xylella fastidiosa* 9a5c in vitro. 2004. 93p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SIMPSON, A. J.; REINACH, F. C.; ARRUDA, P.; ABREU, F. A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALAVES, L. M.; ARAYA, J.E.; BAIA, G. S.; BAPTISTA, C. S.; BARROS, M. H.; BONACCORSI, E. D.; BORDIN, S.; BOVÉ, J. M.; BRIONES, M. R.; BUENO, M. R.; CAMARGO, A. A.; CAMARGO, L. E.; CARRARO, D. M.; CARRER, H.; COLAUTO, N. B.; COLOMBO, C.; COSTA, F. F.; COSTA, M. C.; COSTA-NETO, C. M.; COUTINHO, L. L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A. P.; FERREIRA, A. J.; FERREIRA, V. C.; FERRO, J. A.; FRAGA, J. S.; FRANÇA, S. C.; FRANCO, M. C.; FROHME, M.; FURLAN, L. R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G. H.; GOLDMAN, M. H.; GOMES, S. L.; GRUBER, A.; HO, P. L.; HOHEISEL, J. D.; JUNQUEIRA, M. L.; KEMPER, E. L.; KITAJIMA, J. P.; KRIEGER, J. E.; KURAMAE, E. E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M. R.; LEITE, L. C.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M. V.; LOPES, S. A.; LOPES, C. R.; MACHADO, J. A.; MACHADO, M. A.; MADEIRA, A. M.; MADEIRA, H. M.; MARINO, C. L.; MARQUES, M. V.; MARTINS, E. A.; MARTINS, E. M.; MATSUKUMA, A. Y.; MENCK, C. F.; MIRACCA, E. C.; MIYAKI, C. Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C. B.; MOON, D. H.; NAGAI, M. A.; NASCIMENTO, A. L.; NETTO, L. E.; NHANI, A. Jr.; NOBREGA, F. G.; NUNES, L. R.; OLIVEIRA, M. A.; de OLIVEIRA, M. C.; de OLIVEIRA, R. C.; PALMIERI, D. A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B. R.; PEREIRA, G. A.; PEREIRA, H. A. Jr.; PESQUERO, J. B.; QUAGGIO, R. B.; ROBERTO, P. G.; RODRIGUES, V. de M.; ROSA, A. J.; de ROSA, V. E. Jr.; de SÁ, R. G.; SANTELLI, R. V.; SAWASAKI, H.E.; da SILVA, A. C.; da SILVA, A. M.; da SILVA, F. R.; da SILVA, W. A. Jr.; da SILVERIA, J. F.; SILVESTRE, M. L.; SIQUEIRA, W. J.; de SOUZA, A. A.; de SOUZA, A. P.; TERENCEZI, M. F.; TRUFFI, D.; TSAI, S. M.; TSUHAKO, M. H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A. L.; ZAGO, M. A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J.; SETUBAL, J. C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. Nature, 406,151-157, 2000.

SOUZA, E. C. Análise da expressão gênica global de mutantes de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. 2010. xvi, 128 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/102819>>. Acesso em 13 de junho de 2016.

SPANN, T. M.; ATWOOD, R. A.; YATES, J. D.; GRAHAM, J. H. Dooryard citrus production: citrus canker disease. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, 2007.

STALL, R. E.; SEYMOUR, C. P. Research relating to the citrus in the gulf-coast states. Plant Disease, St. Paul, v.67, p.581-585, 1983.

SUN, Q. H.; HU, J.; HUANG, G. X.; GE, C.; FANG, R. X.; HE, C. Z. Type-II secretion pathway structural gene *xpsE*, xylanase- and cellulase secretion and virulence in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Pathology*, Oxford, v.54, p.15-21, 2005.

SWEIGARD, J. A., and EBBOLE, D. J. Functional analysis of pathogenicity genes in a genomics world. *Current Opinion in Microbiology*, v.4, p.387-392, 2001.

TALON, M.; GMITTER JR, F.G. Citrus Genomics. *International Journal of Plant Genomics*, ID 528361, p.17, 2008.

TAMIR-ARIEL, D.; ROSENBERG, T.; NAVON, N.; BURDMAN, S. A secreted lipolytic enzyme from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is expressed in planta and contributes to its virulence. *Molecular Plant Pathology*, v.13, n.6, p.556-567, 2012.

TSAKALIDOU, E.; ANASTASIOU, R.; PAPADIMITRIOU, K.; MANOLOPOULOU, E.; KALANTZOPOULOS, G. Purification and characterisation of an intracellular X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* ACADC 4. *Journal of Biotechnology*. v.59, p.203–211, 1997.

TENDENG, C.; BERTIN, P. N. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. *Trends Microbiology*, v.11, p.511–518, 2003.

THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C.; BOCH, J.; BÜTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; KAY, S.; KIRCHNER, O.; LANZ, C.; LINKE, B.; MCHARDY, A. C.; MEYER, F.; MITTENHUBER, G.; NIES, D. H.; NIESBACH-KLÖSGEN, U.; PATSCHKOWSKI, T.; RÜCKERT, C.; RUPP, O.; SCHNEIKER, S.; SCHUSTER, S. C.; VORHÖLTER, F. J.; WEBER, E.; PÜHLER, A.; BONAS, U.; BARTELS, D.; KAISER, O. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *Journal of Bacteriology*, v.187, p.7254-7266, 2005.

TONDO, M. L.; PETROCELLI, S.; OTTADO, J.; ORELLANO, E. G. The monofunctional catalase *KatE* of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is required for full virulence in citrus plants. *Public library of science (PLoS) One*. v.5: e10803. doi: 10.1371/journal.pone.0010803. pmid: 20520822, 2010.

USSERY, D. W.; HINTON, J. C. D.; JORDI, B. J.A. M.; GRANUM, P. E.; SEIRAFI, A.; STEPHEN, R. J.; TUPPER, A. E.; BERRIDGE, G.; SIDEBOTHAM, J. M.; HIGGINS, C. F. The chromatin-associated protein H-NS. *Biochimie, Paris*, v. 76, n.10-11, p.968–980, 1994.

VALLS, M.; GENIN, S.; BOUCHER, C. Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLOS Pathogens: A Peer-Reviewed Open-Access Journal*, v.2, n.8,e82, 2006.

VANEECHOUTTE, M.; VERSCHRAEGEN, G.; CLAEYS, G.; FLAMEN, P. Rapid Identification of *Branhamella catarrhalis* with 4-Methylumbelliferyl Butyrate. *Journal of Clinical Microbiology*. p.1227-1228, 1988.

VARGAS, R. G.; GONÇALVES-ZULIANI, A. M. O.; CROCE FILHO, J.; CARVALHO, S. A.; NOCCHI, P. T. R.; NUNES, W. M. C. Avaliação da resistência de variedades de *Citrus* spp. à *Xanthomonas citri* subsp. *citri* na região Noroeste Paranaense, em condições de campo. *Summa Phytopathologica*, v.39, n.4, p.235-241, 2013.



VERNIÈRE, C.; HARTUNG, J. S.; PRUVOST, O. P.; CIVEROLO, E. L.; AILVAREZ, A. M.; MAESTRI, P.; LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. *European Journal of Plant Pathology* v.104, p.477-487, 1998.

VESANTO, E.; SAVIJOKI, K.; RANTANEN, T.; STEELE, J. L.; PALVA, A. An X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (pepX) gene from *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, v.141, p.3067–3075, 1995.

XIA, T.; LI, Y.; SUN, D.; ZHUO, T.; FAN, X.; ZOU, H. Identification of an Extracellular Endoglucanase That Is Required for Full Virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *PLoS One*, v.11, n.3, e. 0151017, 2016.

ZOU, H. S.; SONG, X.; ZOU, L. F.; YUAN, L.; LI, Y. R.; GUO, W.; CHE, Y. Z.; ZHAO, W. X.; DUAN, Y. P.; CHEN, G.Y. EcpA, an extracellular protease, is a specific virulence factor required by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* but not by *X. oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Microbiology*, v.158, n.9, p.2372-83, 2012.

WANG, L.; RONG, W.; HE, C. Two *Xanthomonas* extracellular polygalacturonases, PghAxc and PghBxc, are regulated by type III secretion regulators HrpX and HrpG and are required for virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.21, p.555-563, 2008.

WALKER, N. D.; MCEWAN, N. R.; WALLACE, R. J. Cloning and functional expression of dipeptidyl peptidase IV from the ruminal bacterium *Prevotella albensis* M384(T). *Microbiology*, v.149, p.2227–2234, 2003.

WENGELNIK, K.; Van den ACKERVEKEN, G. & BONAS, U. HrpG, a key hrp regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.9, p.704-712, 1996.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. Proteome research: new frontiers in functional genomics. Germany: Springer-Verlag, p 243, 1997.