UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização de mutantes de *Xanthomonas citri* gerados
por interrupção gênica aleatória usando transposon**

JULIO CESAR LEVANO GARCIA

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Rasera da Silva

São Paulo

6 de Fevereiro de 2003

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005278

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

L655c Levano Garcia, Julio Cesar
Caracterização de mutantes de *Xanthomonas citri* gerados
por disrupção gênica randômica usando transposon / Julio
Cesar Levano Garcia. -- São Paulo, 2003.
96p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Silva, Ana Cláudia Rasera da

I. Disrupção gênica I. T. II. Silva, Ana Cláudia Rasera
da, orientador.

574.88 CCD

“Caracterização de Mutantes de *Xanthomonas citri* Gerados por Disrupção Gênica Randômica Usando Transposon”

JULIO CESAR LEVANO GARCIA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. ANA CLAUDIA RASERA DA SILVA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. MARIE ANNE VAN SLUYS
IB – USP

Profa. Dra. MARILIS DO VALLE MARQUES
ICB – USP

SÃO PAULO
06 DE FEVEREIRO 2003.

*Este trabalho é dedicado em memória de
minha mãe, a pessoa que ajudou-me nos
meus primeiros passos e educou-me com
muita paciência e carinho.*

Celestina Garcia Rodas (1950 – 1987)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força nesta vida.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra. Ana Cláudia Rasera da Silva pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança em mim depositada para desenvolver este trabalho e pela orientação acertada na minha formação científica.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório; Jean Marcel, Leandro Moreira, Stefano Pashalidis, Cassia docena, Paulo Zaini, Fernando Ariel Genta, Renato Alvarenga, Ricardo DeMarco,

Agradeço aos Drs. Sergio Verjovski e Ronaldo Bento pelo seu apoio logístico neste projeto.

Agradeço aos Drs. Jesus Ferro Aparecido, Julio Cezar Oliveira e Luis Furlan da UNESP (Jaboticabal) pelo seu apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço ao Dr. Celso Romero, pela sua amizade e oportunidade de crescer profissionalmente.

Eterna gratidão à minha família pelo apoio e força, embora estejam a seis mil quilômetros de distância: ao meu pai Alejandro, a minha mãe Celestina que estaria contente de ver a seu filho conseguir um dos seus sonhos, a minhas irmãs Miryam e Gladys, e ao meu irmão caçula Ruben.

A Aline Alves Costa, pela sua amizade, carinho, compreensão e apoio constante.

A Erica Barroso pela sua alegria, força, carinho e amizade.

Aos meus amigos pelo sua amizade e apoio, Fernando Gonzales, Dra. Carla Columbano, Juan Aliaga, Erick Saenz, Cesar Remuzgo, Paola Alvarez, Miguel Garay, Luis Pacheco, Diego Butera, Miryam Marroquim, Maria Jose Soares e Katerine Sauer.

A todos os técnicos do bloco 0 superior e ao pessoal da Secretaria de Pos-graduação, pelo seu apoio e paciência demonstrados.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao Instituto de Química pela oportunidade concedida.

Ao COSEAS pela sua acolhida e ao bandeirão.

A todos meus amiguinhos do CRUSP.

INDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 – CEPAS.....	18
3.2 – VETORES.....	18
3.3 – OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	18
3.4 – MEIOS DE CULTURA.....	19
3.5 – ANTIBIÓTICOS.....	19
3.6 – SOLUÇÕES.....	19
3.7 – MÉTODOS.....	20
3.7.1 <u>Teste de autenticidade da bactéria <i>Xanthomonas citri</i></u>	20
3.7.2 <u>Isolamento de DNA plasmidial de <i>E. coli</i></u>	21
3.7.3 <u>Isolamento de DNA genômico</u>	21
3.7.4 <u>Transformação de bactérias</u>	22
a) Eletroporação de <i>E. coli</i>	22
b) Eletroporação de <i>Xanthomonas citri</i>	22
3.7.5 <u>Transposição</u>	23
3.7.6 <u>Mapeamento de clones mutantes por transposição</u>	23
PCR touchdown.....	23
Purificação de amplificadores.....	26
Seqüenciamento.....	26
Identificação do mutante.....	27
3.7.7 <u>Southern blot</u>	27

Transferência.....	27
Marcagem da sonda.....	28
Hibridização.....	28
Construção de mapas de restrição.....	28
3.7.8 <u>Teste de patogenicidade</u>	29
4. RESULTADOS OBTIDOS.....	30
4.1 – <u>Produção de biblioteca de transposon</u>	30
4.2 – <u>Isolamento de DNA genômico</u>	31
4.3 – <u>Mapeamento dos clones da biblioteca de transposon</u>	33
4.4 – <u>Otimização do PCR touchdown</u>	35
4.5 – <u>Teste de eficiência dos oligonucleotídeos semidegenerados</u>	38
4.6 – <u>Identificação dos mutantes</u>	39
4.7 – <u>Southern blot e construção de mapas</u>	49
4.8 – <u>Teste de patogenicidade</u>	56
5. DISCUSSÃO.....	71
6. BIBLIOGRAFIA.....	78
7. ANEXOS.....	92

ABREVIATURAS

°C	graus celsius
aa	aminoácido
BSA	albumina acetilada de soro bovino
Can	canamicina
dATP	deoxiadenosinatrifosfato
dGTP	deoxiguanosinatrifosfato
dTTP	deoxitimidinatrifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
EDTA	ácido etilenoaminotetracético
Kb	quilobase
Kv	quilovoltios
M	molar
mA	miliampére
mM	milimolar
ml	mililitro
OD	densidade óptica
ORF	open reading frame
pb	pares de bases
PCR	reação de polimerase em cadeia
Rnase	ribonuclease
Rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	tris acetato EDTA
TE	tris-EDTA
µg	micrograma
µl	microlitro
pH	potencial de hidrogênio
S	coeficiente de sedimentação
UV	ultravioleta

RESUMO

Xanthomonas axonopodis pv citri (*Xac*), uma bactéria gram negativa, é a causadora da doença Cancro Cítrico que ocasiona enormes prejuízo na citricultura brasileira. Com o seqüenciamento do genoma deste patógeno foram encontradas inúmeras seqüências codificadores com funções desconhecidas. Assim com a finalidade de estudos funcionais do genoma de *Xac*, foram gerados mutantes randômicos usando o transposon EZ::TN , que induziu disrupção aleatoria de seus genes com o intuito de avaliar que genes inativados afetam a patogenicidade da bactéria. Para o mapeamento do local de inserção do transposon foi desenvolvida uma metodologia baseada na técnica de PCR touchdown utilizando oligonucleotídeos semidegenerados. A confiabilidade deste novo método foi comprovada através do mapeamento por Southern blot de alguns mutantes. Conseguiu-se mapear 90 mutantes randômicos com este método. Os testes de patogenicidade em citros mostraram mutantes com sua patogenicidade afetada observando-se variações nos sintomas da doença. Mutantes interessantes contendo uma ORF hipotética inativada ou tendo uma inserção num espaço intergênico foram achadas, sendo também detectados alguns mutantes com nocaute de genes nos seus plasmídeos pXac33 e pXac66.

ABSTRACT

Xanthomonas axonopodis pv *citri* (Xac), a gram-negative bacteria, is the causer of the Citrus Canker disease that produces enormous losses to the brazilian citrus sector. Many coding sequences with unknown functions were found in the genome sequence of this pathogen. Therefore, with the goal of functional studies of Xac's genome, random mutants using the EZ::TN transposon, have been generated, which carry aleatory disruptions of their genes, with the aim of evaluating inactivated genes that potentially affect bacterial pathogenicity. A method based in the PCR touchdown technique using semidegenerate primers was developed for the mapping of the transposon insertion site. The reliability of this new method was tested by means of mapping some mutants using Southern blot. Ninety random mutants were mapped with this method. The pathogenicity tests in citrus showed mutants with their pathogenicity affected and variations in the disease symptoms were observed. Interesting mutants containing an inactive hypothetical ORF or with an insertion in intergenic regions have been found, and also some mutants with inactivated genes in their plasmids pXac33 and pXac66 were detected.

INTRODUÇÃO

Algumas das mais sérias patologias em cultivos são causados por bactérias. Estas bactérias provocam doenças que são particularmente importantes em cidades tropicais e subtropicais onde as condições de umidade são ideais para o crescimento bacteriano. Entre estes patógenos destacamos espécies dos gêneros *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Xylella*, *Pseudomonas* e principalmente *Xanthomonas* pelo grande número de patovares referentes a este grupo (Dowson, 1939). Todas as bactérias deste gênero são gram-negativas e aparecem em todo o mundo causando doenças em plantas. Cepas de *Xanthomonas* podem infectar uma extensa gama de vegetais, aproximadamente 124 espécies de plantas monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas (Leyns et al., 1984).

No Brasil, particularmente no estado de São Paulo, há inúmeras enfermidades bacterianas capazes de prejudicar culturas de grande importância econômica e social, como por exemplo citros, café, cereais, vegetais frescos entre outros (Marques et al., 1994). O Brasil é o maior produtor de laranjas do mundo, produzindo ao redor de 1/3 da produção mundial (AGRIANUAL, 2001). É estimado que o 93,5 % da produção do país está concentrado nos estados de São Paulo (82,4 %), Sergipe (4,7 %), Bahia (3,7 %) e Minas Gerais (2,7 %), Neves & Boteon, 1998. As duas principais patologias que afetam o setor citrícola no Brasil merecem destaque: o cancro-cítrico e a clorose variegada dos citros (CVC).

O cancro-cítrico tem superado a CVC em taxa de expansão ao longo das plantações do Estado, e são estimadas grandes perdas monetárias devido a danos em plantas e frutos, prejudicando a exportação dos mesmos. Esta patologia é causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) ou *Xanthomonas campestris* pv. *citri* ou *Xanthomonas citri* (Swings and Civerolo, 1993), sendo detectado pela vez primeira em 1957 na região Presidente Prudente no estado de São Paulo (Bitancourt, 1957).

O cancro cítrico é caracterizado por formar lesões em frutos, folhagem, e troncos jovens de cultivos de citros (Civerolo, 1984; Schubert et al., 2001; Timmer et al., 1996). **fig 1.** Quando a bactéria ingressa naturalmente no hospedeiro pelos estômatos

das folhas, cresce nos espaços intercelulares do mesófilo esponjoso, aparecendo logo compridas pústulas ou cancro formadas em folhas, caules e frutos, isto porque o patógeno induz nas células do local de infecção dilatação (hipertrofia), divisão (hiperplasia), e logo morte do tecido (necrose), Swarup et al., 1991.

Assim a epiderme é rompida, permitindo a saída em massa de bactérias à superfície da planta. As lesões em frutos podem variar em tamanho por que a casca é susceptível por um maior período e mais de um ciclo de infecção pode acontecer. A qualidade interna do fruto que é infectado geralmente não é afetado mas como produto fresco perde seu valor comercial, e quando a doença é severa acontece desfoliação e queda precoce do fruto, causando também perda na produção (Koizumi, 1985).

Fig 1. (A) Lesões de caule em laranja ‘Hamlin’. (B) Lesões de fruto em laranja ‘Pineapple’. (C) Lesões de cancro em folha de laranja ‘Valencia’, mostrando halos cloróticos. Fonte: T.R. Gottwald.

Identificação e Diagnóstico

Xanthomonas citri apresenta-se em placas com agar como colônias circulares, convexas e amarelas. Quando glicose ou outros açúcares são adicionados ao meio de cultura, as colônias tornam-se muito mucóides devido à secreção de uma goma composta de polissacarídeos. (fig 2). A temperatura ótima para crescimento da bactéria é de 28 a 30 °C e a faixa de máxima temperatura de crescimento é de 35 a 39 °C (Rudolph et al., 1990).

Há distintas formas da doença cancro cítrico causado por vários patovares e variantes da bactéria *Xanthomonas citri*, mas os sintomas são geralmente similares e a separação destes tipos é baseada nos hospedeiros alvos, nas características fisiológicas, sensibilidade a bacteriófagos (Civerolo, 1984), sorologia (Alvarez et al., 1991), “fingerprint” de plasmídeos (Pruvost et al., 1992), homologia DNA-DNA (Egel et al., 1991) e por várias análises usando RFLP e PCR (Cubero & Graham, 2002; Hartung, 1992; Hartung & Civerolo, 1989; Hartung et al., 1996; Vèmiere et al., 1998). A

forma asiática do cancro (Cancro A), causado por *Xanthomonas citri*, é a forma mais espalhada e mais severa da doença.

Métodos de PCR foram desenvolvidos para uma rápida e segura identificação da bactéria isolada em cultura e de extratos de folhas e frutos com lesões da doença (Cubero et al., 2001; Hartung et al., 1993). Os oligonucleotídeos usados para o diagnóstico do cancro cítrico são baseados no gene *pthA* contido no plasmídeo, o qual é o elemento de virulência primaria em todas as cepas que causam cancro cítrico (Hartung et al., 1996; Yang and Gabriel, 1995). Um segundo protocolo usa oligonucleotídeos baseados na variação das seqüências das regiões intergênicas dos DNAs ribossomais 16S e 23S, e estes oligonucleotídeos também foram desenhados para distinguir as variantes que causam cancro cítrico. (Hauben et al., 1997; Anthony et al., 2000).

Sintomas e processo de infecção

A bactéria espalha-se em lesões em folhas, troncos e frutos. Quando há umidade nas lesões, as bactérias escorrem e podem ser espalhadas para outras plantas, sendo que uma gota d’água de chuva recolhida em uma folhagem com lesões pode conter entre 10^5 a 10^8 ufc/ml (Goto, 1962; Stall et al., 1980). A chuva levada pelos ventos é o maior agente natural de dispersão e os ventos ajudam na penetração da bactéria através dos

Fig 2. Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, em meio nutritivo com agar mostrando produção do pigmento amarelo xanthomonadina e aparência geral mucoide. Fonte: T.R. Gottwald.

estômatos das folhas (Gottwald and Graham, 1992; Graham et al., 1992), **fig. 3**. As bactérias também podem entrar por ferimentos feitos por arranhão ou por insetos, como a larva minadora. As lesões em forma de serpentinas causadas pelo minador de folhas de citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton) promovem um amplo dano nas folhas ficando vulnerável a uma maior infecção pelo patógeno, amplificando grandemente o cancro cítrico na planta. (Cook, 1988; Rodrigues et al., 1998; Sinha et al., 1972; Sohi and Sandhu, 1968).

Estudos de inóculos mostraram que a pressão da água é capaz de transportar as bactérias através das aberturas dos estômatos levando a infecção e formação de lesão (Gottwald and Graham, 1992; Graham et al., 1992). A poda causa severos ferimentos nas plantas e pode ser também um sítio de infecção.

Fig 3 . Microscopia eletrônica de varredura do estômato em folha de citros com bactéria *Xanthomonas citri* entrando pela abertura. Fonte: J. Cubero.

A multiplicação da bactéria acontece principalmente no tempo que as lesões estão se expandindo-se e o número de bactérias produzidos por lesão está relacionado à vulnerabilidade da planta. As bactérias podem também sobreviver nas margens das lesões em folhas e frutos até que estes comecem a se

decompor. A bactéria também sobrevive em lesões dos ramos lenhosos por alguns anos ou mesmo estas podem

sobreviver por anos em tecidos infectados que foram guardados secos (Goto, 1992). Contudo a morte da bactéria é acelerada pela exposição direta a luz do sol.

Todos os tecidos novos das plantas de citros acima da terra são susceptíveis a *Xanthomonas citri*, e a bactéria mostra-se ser mais agressiva durante a metade final da sua fase exponencial de crescimento (Gottwald and Graham, 1992; Stall et al., 1980).

No início da doença (7 dias após infecção) aparecem lesões leves similares a bolhas, sendo que as condições ideais de manifestação estão relacionadas com um ótimo de temperatura ao redor de 20 a 30 °C (Koizumi, 1985). Sob condições de infecção e incubação diferentes, os sintomas podem levar até 60 dias para aparecer (Gottwald and Graham, 1992; Loucks, 1934). Com o tempo, no lugar da infecção, as lesões tornam-se de cor canela claro depois de cor canela a marrom e aparecem nas bordas das lesões uma leve dilatação do tecido chamado encharcamento (“water-soaked”) que é freqüentemente rodeado por um halo clorótico. A margem de encharcamento pode desaparecer conforme o tempo da lesão. O centro da lesão torna-se saliente e esponjoso. Estas lesões da infecção em folhas com aparência em relevo são visíveis por ambos os lados da folha. Os centros das lesões tornam-se similares a uma cratera e espalham-se, chamando esta característica de efeito “Shot-hole”(Goto and Yaguchi 1979; Gottwald, et al. 1988; Gottwald, et al 1989) (fig. 4A). Um sintoma essencial para o diagnóstico é a hiperplasia do tecido dos citros induzido pelo patógeno (excessiva divisão celular não controlada), resultando em cancro. (fig. 4B)

Fig 4. (A) Folha de laranja ‘Hamlin’ com sintoma “watersoaking” ao redor das lesões do cancro. Fonte: J.H. Graham **(B)** Amostra de seção de folha com hiperplasia produzido pelo patógeno Fonte: D.W. Gabriel

Hospedeiros Alvos

Civerolo 1984, lista um número de plantas da família Rutaceae que podem servir como hospedeiros de *Xanthomonas citri*, sob condições experimentais. Entre as variedades de citros a cepa bacteriana Asiática que causa o cancro cítrico é mais severa

em pomelos (*C. paradisi* Macf), limas (*C. aurantiifolia* Swingle, *C. limettioides* Tan), limões (*C. limon* Burm.f.) e laranjas doces (*C. sinensis* (L.) Osb.) e seus híbridos por causa de sua alta vulnerabilidade.

Interação com larva minadora

Um fator que favorece grandemente a disseminação da doença é a larva minadora dos citros *Phyllocnistis citrella* Station, (fig 5A) uma praga de grande importância na citricultura brasileira, pois além dos danos diretos causados pelo seu ataque nas folhas novas das brotações, tem um importante papel como agente disseminador do cancro cítrico, devido às lesões que provoca nas folhas que facilitam a entrada da bactéria e o seu crescimento na epiderme. (Knapp et al., 1995). Levantamento realizado pelo FUNDECITRUS têm revelado aumento do número de focos de cancro cítrico, atribuído principalmente à presença da larva minadora (Fundecitrus, 2000).

Antes de 1994, a larva minadora dos citros estava limitada em distribuição primariamente no sudeste da Ásia. Após a metade de 1990, a larva minadora espalhou-se por inúmeras regiões produtoras de cítricos do mundo, chegando a Florida em 1993 (Heppner, 1993) e foi reportado pela primeira vez no Brasil em março de 1996, na região de Limeira, Estado de São Paulo. Dois meses após encontrava-se disseminada por todo o estado. Atualmente encontra-se nos estados de SP, AM, RO, RR, PI, BA, MS, GO, MG, RJ, PR e TO (Nascimento et al., 1998) A larva minadora forma galerias na camada celular epidermal de novas folhas e outros tecidos, levantando e eventualmente rasgando a cutícula (Achor et al., 1996; Graham et al., 1996). As atividades de alimentação da larva minadora facilitam a infecção de *Xanthomonas citri* em duas vias. Primeiro, a rasgadura da cutícula descobre o mesófilo da folha para uma direta infecção bacteriana quando as bactérias dispersadas em pingos de chuva e levadas pelo vento tomam contato com as superfícies das folhas. Segundo a larva minadora pode contaminar-se com as bactérias e transportá-las a estas através das galerias que vai fazendo. Isto resulta em numerosas infecções do mesófilo dentro das galerias (Graham, et al., 1996). **fig. 5B**

Fig 5. (A) Adulto e larva do minador de folhas. **(B)** Interação entre cancro cítrico e a larva minadora *Phyllocnistis citrella* mostrando infecções pela bactéria *Xanthomonas citri* levadas pela larva através das galerias enquanto esta se alimenta

Para que o processo de infecção e patologia vegetal se desencadeie, *Xanthomonas citri* necessita de alguns genes clássicos relacionados com esta função, entre eles os genes *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity”), capazes de provocar uma resposta de hipersensibilidade da planta (HR). Estão presentes tanto em *Xanthomonas* como em *Pseudomonas*; genes de avirulência (*avr*), que controlam a virulência de cada patógeno de um patovar específico em seus hospedeiros. Estes genes atuam como fator negativo, o qual limita a virulência bacteriana diante a estimulação da resposta HR na planta. A resposta HR é caracterizada por morte celular programada nos tecidos ao redor ao sítio da infecção, o qual atenua a propagação da doença. (Herbers et al., 1992; Chen et al., 1994; Yang et al., 1994; Yang and Gabriel, 1995). Análise de seqüências de todos os genes *avr* mostrou que as proteínas preditas são hidrofílicas e não contem uma seqüência de peptídeo sinal, sugerindo uma possível função intracelular (Leach and White, 1996). Os genes *avr* mais caracterizados são o gene *avrBs3* e seus homólogos, sendo que inicialmente o gene *avrBs3* foi isolado do patógeno *X. campestris pv vesicatoria* que codifica uma proteína de 122 kDa, caracterizado por mostrar uma repetição conservada de 34 aa. (Bonas et al., 1989). Outros genes homólogos a *avrBs3* mostraram contribuição nos sintomas de encharcamento em plantas (Yang et al., 1996)

Varios genes *avr* microbianos podem produzir um HR quando são expressados nas células da planta contendo genes *R* específicos de resistência (Gopalan et al., 1996),

assim genes *avrB* e *avrRpt2* induzem morte celular e necrose em plantas desprovidas de genes *R*, sugerindo uma possível relação destes genes com patogenicidade. (McNellis et al., 1998). Além disso, sabe-se que *Xanthomonas citri* apresenta o gene de patogenicidade *pthA*, (gene de avirulência/virulência) que lhe confere a principal característica patológica, a proliferação descontrolada de células (o cancro) e indução de HR em hospedeiro não-específico. A transferência deste gene a outros patovares de *Xanthomonas* confere a estes a habilidade para induzir cancro cítrico em cítricos (Swarup et al., 1991; 1992).

O gene *pthA* pertence a uma grande família de genes de avirulência /patogenicidade (*avrBs3/pthA*), que se encontra no gênero *Xanthomonas*. (Leach and White, 1996).

Para que os fenótipos de patogenicidade ou avirulência sejam produzidos pelos fitopatógenos bacterianos, precisa-se de um sistema funcional de secreção de proteínas tipo III codificado pelos genes *hrp* : "hypersensitive response and pathogenicity". (He 1998; Alfano and Gabriel, 1995a). A função de *pthA* em *Xanthomonas citri* para patogenicidade ou avirulência é dependente do *hrp*. (Yang and Gabriel, 1995a).

Expressão de *pthA* em células de citros é suficiente para produzir os sintomas da doença: hipertrofia, hiperplasia, e necrose. (Duan et al., 1999). Outros estudos indicam que o *pthA* gera morte celular programada (PCD) em citros, em adição à divisão e dilatação celular. Pensa-se que a indução da morte celular é de importância pelo fato de prover nutrientes para os patógenos bacterianos em especial quando estes são liberados na superfície da folha. (Greenberg, 1997). Induzindo PCD pode ser essencial para conseguir elevados níveis de crescimento de *Xanthomonas citri*, porém mutações do *pthA* em *Xanthomonas citri* reduzem de forma significativa seu crescimento em plantas (Swarup et al., 1991).

Disrupção de genes

A disponibilidade de seqüências completas do genoma bacteriano nos oferece uma abundância de informação na estrutura molecular e organização de muitos genes dos quais suas funções são pobremente entendidas. Com o seqüenciamento do genoma de

Xanthomonas citri, (Da silva et al., 2002) foram encontradas seqüências codificadoras que foram classificadas dentro de grupos funcionais (anexo 1). Podemos também destacar um grupo de CDS cujas funções putativas não foram determinadas. Em alguns casos estas ORFs também se encontram em *Xylella fastidiosa*, outro patógeno de citrus já seqüenciado (Simpson et al., 2000). Assim, estas ORFs poderiam estar relacionadas ao metabolismo e adaptações ao mesmo hospedeiro, os citros.

Uma análise mutacional de genes pode prover significativa visão de sua função. Uma das maneiras de descobrir a função das múltiplas ORFs não caracterizadas é promover a disrupção de uma ORF (nocaute) e estudo do mutante resultante, fazendo testes de patogenicidade em plantas (Dow et al., 2000; Ojanen-Rheus et al., 1997)

Para inativar genes do cromossomo bacteriano uma estratégia seria o método para troca de alelos que promoveria a disrupção do gene com um plasmídeo apropriado (Russell et al., 1989; Metcalf et al., 1996; Pósfaï et al., 1999). Outra estratégia para conseguir a disrupção de um gene é a mutagênese por transposição (Akerley et al., 1998; Guilhabert et al., 2001). Com esta última estratégia o genoma posteriormente é rastreado à procura dos locais de inserção do transposon, e os mutantes são classificados de acordo com suas propriedades funcionais. Este método pode identificar genes essenciais, fatores de virulência, e outros tipos de fenótipos (Smith et al., 1996; Smith et al., 1995; Hensel et al., 1995)

Os elementos transponíveis são, agora, valiosas ferramentas mutagênicas para análises moleculares e genéticas (Voelker and Dybvig, 1998). O transposon mais usado em bactérias gram-negativas é o Tn5 (Bruijn and Lupski, 1984), o qual se insere em alta frequência, tendo uma pequena especificidade seqüência-alvo (Goryshin et al., 1998), e não compartilha homologia com seqüências genômicas de muitas espécies bacterianas (Berg and Berg, 1983).

A mutagênese com transposon pode ter algumas dificuldades técnicas como: o gene da transposase deve ser expresso na bactéria alvo; o transposon deve ser introduzido na bactéria em um vetor suicida; o gene da transposase pode ser expresso em subseqüentes gerações, o que pode resultar em instabilidade genética. Para se evitar esses problemas, Goryshin et al. (2000) desenvolveu o sistema “transposome”. Este sistema associa a hiperativa transposase Tn5 com um minitransposon Tn5 linear, que

contém um marcador de seleção flanqueado em cada extremo por uma sequência de reconhecimento para a transposase, de 19 bp, do Tn5 (Goryshin and Reznikoff, 1998).

No caso de *Xanthomonas citri* para a geração de mutantes usou-se o sistema de inserção EZ::TN <KAN-2>, baseado no simples mas elegante sistema de transposição Tn5 desenvolvido por Goryshin e Reznikoff (1998) o qual permite alta eficiência da inserção randômica de um Transposon EZ::TN <KAN-2> em uma molécula DNA alvo, fazendo mutantes por inserção ou disrupções de genes, *in vitro*. O Transposon contém um marcador de resistência a canamicina.

Para conseguir mapear mutantes randômicos precisa-se conhecer as sequências genômicas que flanqueiam o sítio de inserção, usando como ferramenta o PCR para amplificar estas regiões. Os amplificadores das regiões que flanqueiam as inserções em mutantes de interesse são então sequenciados e comparados à sequência genômica para encontrar os genes inativados. (Hencel et al., 1995).

A metodologia de procura de mutantes está baseada em avaliar gene por gene procurando diferentes inserções no mesmo gene. Por exemplo a metodologia Genetic footprinting (Smith et al., 1996; Smith et al., 1995), necessita da sequência completa do genoma, devido ao uso do PCR usando oligonucleotídeos específicos desenhados que hibridizam nos extremos de cada gene a ser rastreados no genoma, e o outro oligonucleotídeo específico que anela no extremo do transposon, sendo esta metodologia limitada a mapear genes essenciais.

Outro procedimento para tentar mapear mutantes randômicos usando transposon está baseado na clonagem dos fragmentos de restrição do DNA genômico do mutante, onde o vetor que contém o inserto com o gene de resistência (transposon), será achado sob meio seletivo com antibiótico. Os insertos clonados são sequenciados e com os dados obtidos, localizado o sítio de inserção e gene nocauteado.

PCR touchdown

Nas metodologias desenvolvidas para o mapeamento de mutantes randômicos existem limitações para o rastreamento em massa de genes nocauteados devido a falta de primers adequados para regiões desconhecidas e condições de PCR afim de se obter

ótimos amplificados. Uma ferramenta que pode ajudar é o PCR touchdown (Don et al., 1991) o qual é um método para otimizar o PCR evitando anelamentos inespecíficos durante a amplificação, mesmo que o grau de complementariedade iniciador-modelo não seja totalmente determinado (Rose et al., 1998; Fietto et al., 2002). Esta variante do PCR está baseada em uma diminuição da temperatura de anelamento em cada ciclo subsequente e a amplificação começa quando o T_m da combinação específica iniciador-modelo é atingida, permitindo a obtenção de uma maior quantidade de amplificados específicos no início da reação sobre amplificados não específicos. (Don et al., 1991; Hecker and Roux, 1996).

O uso de oligonucleotídeos degenerados no PCR tem sido usado para tentar amplificar genes homólogos em diferentes organismos (Skantar and Carta, 2000) sendo que os oligonucleotídeos são desenhados baseados em conhecimento parcial de regiões conservadas de aminoácidos (Dieffenbach et al., 1993; Rychlik et al., 1995) Estes oligonucleotídeos degenerados têm variações de bases numa mesma posição o que nos permite ter um maior número de possibilidades para o anelamento e amplificação de uma variedade de seqüências relacionadas.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste projeto é produzir, mapear e caracterizar uma biblioteca de *Xanthomonas citri* com inserção randômica de um transposon rompendo um determinado gene .

- Para isto desenvolvemos uma metodologia utilizando PCR touchdown para amplificar fragmentos do genoma da bactéria adjacentes ao sítio de inserção do transposon, e desta forma mapear os genes nocauteados.
- Estes mutantes também foram avaliados com testes de inoculação em plantas para descobrir quais genes inativados afetam a patogenicidade da bactéria.

3. MATERIAIS E METODOS.

3.1 - CEPAS

Xanthomonas axonopodis pv citri isolado 306; cepa tipo selvagem que causa o cancro cítrico em laranjeira.

E. coli DH10B. *F mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi80dlacZDM15$ *DlacX74 deoR recA1 endA1 ara* $\Delta139$ $\Delta(ara,leu)7697$ *galU galK* λ *rpsL nupG*

3.2 – VETORES

Transposon-transposase Tn5, kit de inserção **EZ::TN<KAN-2>** Epicentre Technologies (Ref. Goryshin et al., 2000).

p2b-2TN. Fragmento de DNA de 0,45 Kb de *X. axonopodis pv. citri* 306 vindo do clone A0CE6503C10 e subclonado no vetor pUC19. Transposon EZ::TN<KAN-2> inserido no gene de AMP^r. Usado como controle positivo no “southern blot” (Ref. este estudo).

pUFR043. Inc W, Gm^r, Km^r, Mob⁺, lacZ α ⁺, cos (Ref. De Feyter and Gabriel, 1991).

3.3 - OLIGONUCLEOTÍDEOS

Os oligonucleotídeos abaixo foram desenhados com o auxílio do programa Gen RunnerTM.

Tnkan-F : 5' CGATGAATTGTGTCTCAAAA 3'

Tnkan-R: 5' CAGGTCGACTCTAGAGGATC 3'

Foram também utilizados oligonucleotídeos do kit de transposição (Epicentre technologies):

KAN-2 FP-1 : 5' ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC 3'

KAN-2 RP-1 : 5' GCAATGTAACATCAGAGATTTTGA G 3'

Oligonucleotídeos semidegenerados (Fietto et al., 2002):

APYBAF1-ecoai:5' ‘

5' CGGAATTCCGTGTTAAATATGGTATTGTGATNGAYKSNGGNTC 3'

HIB17.

5' CGGAATTCCGGATNGAYKSNGGNTC 3'

Oligonucleotídeos para o teste de autenticidade da bactéria :

(gene *pth A*):

XANTPTHAUP : 5' GCGGGATACGGCAGAAATG 3'

XANTPTHADOWN: 5'ATTGCACCTCATCCCACTCGC 3'

3.4 - MEIOS DE CULTURA

KLB. Triptona 1%; extrato de carne 0,3%; pH 7,0. **KLB-Can:** KLB contendo canamicina na concentração final de 50 µg/ml. Para meios sólidos adiciona-se agar a 1,5%.

2xTY₋ Triptona 1,6%, extrato de levedura 1%, NaCl 0,5 % ; pH 7,4.

2xTY-glicerol: Triptona 1,6%, extrato de levedura 1%, NaCl 0,5 % , glicerol 8%.

SOB. Triptona 2%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,05%; KCl 2,5 mM; pH 7,5;

SOC. Meio SOB com glicose 20mM e MgCl₂ 10mM.

Placas TYE. Triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,8%; agar a 1,5%

3.5 – ANTIBIÓTICOS

Canamicina. Solução estoque 100 mg/ml (Sigma), estocada a -20 °C.

Carbenicilina . Solução estoque 100 mg/ml (Life technologies), estocada a -20 °C;

3.6 – SOLUÇÕES

Ribonucleasa A (10 mg/ml), Acetato de sódio 0,01M, estocada a -20 °C.

Solução de Depuração. HCl 0,25 M;

Solução de Denaturação. NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M;

Solução de Neutralização. Tris-HCl 0,5 M pH 8,0; NaCl 1,5 M;

Tampão 20x SSC. NaCl 3M, citrato de sódio 0,3 M.;

Solução de Lise. 1% SDS, NaOH 200 mM;

Solução de CaCl₂ NaAc 20mM pH 6,5; CaCl₂ 0,1 M.

Tampão de lavagem de células. Tris-HCl 10mM, pH 8,8; NaCl 1,25mM; KCl 3mM

Solução D. Citrato de sódio pH 7,0; 0,5% Sarcosil; Isotiocianato de Guanidina 4M

Tampão TE. Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0.

Tampão TE-RNase Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0; 10 µg/ml

Solução de prehibridização. NaCl 1M, SDS 1%, Dextran 10%

TAE: Para uma solução 1X usa-se Tris-acetato 0,04 M; EDTA 0,001M a pH 8,0

3.7- MÉTODOS

3.7.1 Teste de autenticidade da bactéria *Xanthomonas citri*

A autenticidade da bactéria, foi avaliada utilizando a técnica de PCR, amplificando-se uma região de patogenicidade no genoma da bactéria, o qual serveu como marcador molecular na identificação. Os seguintes oligonucleotídeos foram usados neste método: PTHA UP e PTHA DOWN (patogenicidade).

A reação de PCR foi feito usando as seguintes condições: 94 °C por 3 min. e 30 ciclos de 94 °C por 30 seg.; 50 °C por 30 seg.; 68 °C por 8 min., usando a enzima Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. (tabela 1). Após isso, os produtos do PCR foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1%, 90 volts, 1 hora; o gel foi corado numa solução de brometo de etídio e visualizado através de um trans-iluminador UV.

TABELA 1

	1
Buffer 10x PCR	5,0 µl
dNTPs (10mM)	1,0 µl
MgSO ₄ (50mM)	2,0 µl
Primer pTHA down (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer pTHA up (10 pmol/µl)	1,0 µl
DNA genômico (100ng/µl)	1,0 µl
Água mili Q qsp 50 µl	38,7 µl
Taq DNA polimerase	0,3 µl

3.7.2 Isolamento de DNA plasmidial de *E. coli*

O DNA plasmidial foi extraído da bactéria de acordo com o método descrito por Sambrook et al., 1989, utilizando lise alcalina com SDS 1% e 200mM NaOH, precipitando o DNA com etanol.

3.7.3 Isolamento de DNA genômico

a) Protocolo do Reagente DNAzol^R (Life technologies):

- Cultivou-se *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* em meio KLB (20 ml) com canamicina (50 µg/ml) a 28°C e 210 rpm, por 16 horas e, a partir da cultura saturada, pegou-se 2 ml que foi submetido a uma centrifugação de 10 000 g por 5 minutos. Após foi adicionado 1 ml do reagent DNAzol^R, lisando as células com suave homogenização
- O homogenizado foi sedimentado por centrifugação a 10 000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante viscoso foi transferido para outro tubo;
- Precipitou-se o DNA do lisado (sobrenadante) por adição de 0,5 ml de etanol 100% por 1 ml de DNAzol usado.
- Lavou-se o DNA precipitado com 1 ml de etanol 75 % (duas vezes), por inversão do tubo, desprezando ao término o etanol.
- Para solubilizar o DNA, o mesmo secado a temperatura ambiente por 15 minutos e ressuspendido com a solução de tampão TE , pH 8,0.

b) Protocolo desenvolvido no laboratório de biologia molecular da FCAV/ UNESP Jaboticabal (Dr. Luis Roberto Furlan).

- Cultivou-se os mutantes de *Xanthomonas citri* em caixas de 96 pocinhos usando o meio KLB (1 ml) com canamicina (50 µg/ml) a 28 °C e 210 rpm, por 16 horas, e as culturas saturadas, foram submetidas a uma centrifugação de 4 000 g por 15 minutos.
- Ressuspendeu-se os pellets em 500 µl de tampão de lavagem (.Tris-HCl 10mM, pH 8,8; NaCl 1,25mM; KCl 3mM) e centrifugou-se a 4 000 rpm por 15 min. Este passo foi repetido mais duas vezes.

- Os pellets foram ressuspensos em 100 µl de solução D (Citrato de sódio pH 7,0; 0,5% sarcosil; Isotiocianato de Guanidina 4M) e incubado em banho maria a 65 °C por 1 hora., para lisar as bactérias (opcional: foi usado shaker com rotação de 200 rpm, 4 horas)
- Após foi adicionado 250 µl de solução saturada de NaCl e homogenizado com vortex.
- Os lisados foram centrifugados a 4 000 rpm por 15 min. e foram transferidos 100 µl do sobrenadante para uma nova placa, evitando a transferência do precipitado.
- Adicionou-se 130 µl de Isopropanol gelado, misturado com vortex e logo centrifugado a 4 000 rpm por 45 min. Após os pellets foram lavados duas vezes com 130 µl de etanol 70 % e após cada lavagem as amostras foram centrifugadas a 4 000 rpm por 30 min. \
- As amostras foram resuspensas em 40 µl de TE-Rnase.

3.7.4 Transformação de bactérias

a) Eletroporação de *E. coli*

Segundo Dower et al. (1988) uma cultura de bactérias crescendo a 37 °C até uma OD₆₀₀ de 0,6 (cultura em fase logarítmica) foram concentradas e após lavagens em água estéril gelada (duas vezes) e glicerol 10 % (duas vezes), as bactérias foram conservadas em glicerol 10% a -70 °C. As células competentes foram eletroporadas com DNA plasmidial (novas construções) com o Micropulser™ ou Gene Pulser (BIO-RAD), ajustado com uma capacitância de 25 µFD , uma voltagem de 2,5 kV em cubetas de 0,2 cm e o controlador de pulsos a uma resistência de 100 Ω .

b) Eletroporação de *Xanthomonas citri*

Células de *Xanthomonas citri* foram crescidas a 28 °C com agitação durante a noite até uma OD₅₀₀ de 0,5-1,0; após lavagens com água estéril gelada (duas lavagens) e com glicerol 10% gelado (uma lavagem), as células foram concentradas em glicerol 10% gelado, e eletroporadas com o DNA plasmidial (controle +) e com o complexo transposome com o Micropulser™ (BIO-RAD) a 2,0 Kv ou Gene pulser(BIO-RAD), a uma voltagem de 2,0 kV ; 25 µFD; 200 Ω em cubetas de 0,2 cm.

3.7.5 Transposição

O sistema de inserção EZ::TNTM <KAN-2> (Epicentre technologies), foi usado para induzir nocaute de genes em *Xanthomonas citri*, e este sistema permite uma alta eficiência de inserção randômica de um transposon à molécula de DNA alvo *in vitro* (**anexo 3**). O transposon contém um marcador de resistência a Canamicina.(Can^r). (**anexo 2**), Goryshin e Resznikoff et al., 1998.

Usou-se este sistema seguindo o protocolo do fabricante:

0,5 µl Transposon EZ::TN <KAN-2>

1,0 µl Transposase

0,5 µl Glicerol 10%

2,0 µl

Essa reação foi incubada por 10 min a 37 °C, depois foi misturada com 100 µl de células competentes de *Xanthomonas citri*, e posteriormente eletroporadas. Os mutantes foram selecionados em meio KLB agar com canamicina (50 µg/ml).

3.7.6 Mapeamento de Clones mutantes por transposição

PCR touchdown

Isolados de DNA genômico (DNAg) dos mutantes randômicos foram submetidos a PCR touchdown (**fig 6**) usando os oligonucleotídeos específicos (KAN-2 FP-1 ou KAN-2 RP-1) e os oligonucleotídeos semidegenerados (APYBAF1 ou HIB17) em diferentes concentrações. (**Tabela 2**). Usou-se os seguintes ciclos de temperatura: um passo inicial de 95 °C/ 5 min, após esta primeira ciclagem, a reação é feita da seguinte forma: 95 °C/ 45 seg. (denaturação); 60 °C/ 45 seg. (anelamento) o que foi decrescendo em 0,5 °C. (esta etapa de 60° C a 45 °C em decrescimento de 0,5 °C no período de 30 ciclos); e 72 °C/ 2 min (extensão).

Depois foi feito uma segunda rodada de amplificação de 10 ciclos com: 95 °C/45 seg; 50 °C/45 seg; 72 °C/ 2 min.

Fig 6 Esquema da estratégia de amplificação de fragmentos híbridos que incluem seqüências da região terminal do transposon (linhas vermelhas) e seqüências do DNA genômico adjacente ao transposon (linhas pretas).

DNAg	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng
MgSO ₄	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
Primer específico KAN-2 RP-1	10 pmol	10 pmol	10 pmol	10 pmol	10 pmol	10 pmol	20 p mol	20 pmol	20 pmol	20 pmol	20 pmol	20 pmol
Primer degenerado APYBAF1	10 pmol	50 pmol	100 pmol	X	X	X	10 pmol	50 pmol	100 pmol	X	X	X
Primer degenerado HIB17	X	X	X	10 pmol	50 pmol	100 pmol	X	X	X	10 pmol	50 pmol	100 pmol
dNTPs (10mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Buffer HiFi 10 X	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
Agua qsp 50 µl	36,2 µl	32,2 µl	27,2 µl	36,2 µl	32,2 µl	27,2 µl	34,2 µl	30,2 µl	25,2 µl	34,2 µl	30,2 µl	25,2 µl
Taq pol HiFi	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl

Tabela 2 : Protocolo do PCR touchdown

Os oligonucleotídeos usados no PCR touchdown foram também testados quanto a sua especificidade através da sua adição única na reação do PCR.. (tabela 3)

	1	2	3
DNA g	400 ng	400 ng	400 ng
Mg SO ₄ (50 mM)	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
Primer específico KAN-2 RP-1	20 pmol	X	X
Primer degenerado APYBAF1	X	50 pmol	X
Primer degenerado HIB17	X	X	50 pmol
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
Buffer HiFi 10 X	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
Agua qsp 50 µl	37,2 µl	34,2 µl	34,2 µl
Taq Pol HiFi	0,3 µl	0,3 µl	0,3 µl

Tabela 3 : PCR touchdown- controles

Testou-se modificações nas condições de ciclagem do PCR touchdown com as seguintes variações:

Condição 1 : Usou-se o oligonucleotídeo KAN-2 FP-1 (20 pmol) e o oligonucleotídeo HIB17 ou APYBAF1 (100 pmol) nas seguintes condições: passo inicial de 95 °C/ 5 min, com uma primeira ciclagem de 95 °C/ 30 seg., 60°C/ 30 seg. (decrecendo -0,5 °C/ciclo), 72 °C/ 1 min. por 30 ciclos. Uma segunda ciclagem de 95 °C/ 30 seg., 45 °C/ 30 seg., 72 °C/ 1 min., por 10 ciclos.

Condição 2 : Usou-se o oligonucleotídeo KAN-2 FP-1 (20 pmol) e o oligonucleotídeo HIB17 (100 pmol) nas seguintes condições: com passo inicial de 95 °C/ 5 min. com uma primeira ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 60 °C/ 45 seg. (decrecendo -0,5 °C/ciclo), 72 °C/ 2 min. por 25 ciclos. Uma segunda ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 50 °C/ 45 seg., 72 °C/ 2 min., por 25 ciclos.

Condição 3 : Usou-se o oligonucleotídeo KAN-2 FP-1 (20 pmol) na seguinte condição: com passo inicial de 95 °C/ 5 min. com uma primeira ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 65 °C/ 30 seg., 72 °C/ 1 min. por 20 ciclos. Adicionou-se o oligonucleotídeo HIB17 + 0,3 µl de enzima Taq polimerase e uma segunda ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 60 °C/ 30 seg. (decrecendo -0,5 °C/ ciclo), 72 °C/ 1 min., por 30 ciclos. e uma terceira ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 45 °C/ 30 seg., 72 °C/ 1 min., por 10 ciclos. (sendo recomendável dobrar a concentração de dNTPs para esta condição)

Condição 4 : Usou-se o oligonucleotídeo KAN-2 FP-1 (20 pmol) e o oligonucleotídeo HIB17 (100 pmol) nas seguintes condições: com passo inicial de 95 °C/ 5 min. com uma primeira ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 60 °C/ 30 seg. (decrecendo -0,5 °C/ciclo), 72 °C/ 1 min. por 25 ciclos. Uma segunda ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 50 °C/ 30 seg., 72 °C/ 1 min., por 25 ciclos.

Purificação de amplificadores

Os produtos de PCR touchdown foram purificados usando o kit CONCERT™ Rapid PCR Purification System (Life technologies), o procedimento foi feito de acordo às recomendações do fabricante:

Adicionou-se 400 µl de Buffer H1 (guanidine hidrócloride, EDTA, Tris-HCl, e isopropanol) na reação de amplificação e o homogenizado foi carregado a um cartucho com filtro que captura o DNA e centrifugado a 12 000g por 1 min..

Carregou-se 700 µl de Buffer de lavagem H2 (NaCl, EDTA e Tris-HCl) no cartucho e centrifugado a 12 000g por 1 min, desprezado o fluxo, centrifugou-se 12 000g por mais 1 min. para tirar o buffer.

O cartucho foi colocado num tubo eppendorf de 1,5 ml e adicionou-se 50 µl de buffer TE (esquentado a 65 °C) e centrifugado a 12 000g por 2 min.

Seqüenciamento

A reação de seqüenciamento do DNA basearam-se em uma adaptação do método Dideoxi de Sanger (Sanger et al., 1977) com o uso de um kit fornecido pela Applied Biosystems. O método utiliza uma polimerase termoestável (Ampli Taq polimerase) com os oligonucleotídeos específicos KAN-2 RP-1 ou KAN-2 FP1 usados também no PCR touchdown.

Os ddNTPs não radioativos, são ligados covalentemente às substâncias fluorescentes específicas para cada ddNTP, que após excitação pelo feixe de laser do seqüenciador (ABI PRISM 377 – PE), emitem fluorescência em comprimentos de ondas diferentes, identificando cada uma das quatro bases (A, T, G, C).

As condições de ciclagem da reação PCR foi: 96 °C/ 10 seg., 50 °C/ 5 seg., 60 °C / 4 min., por 40 ciclos. usando as recomendações do fabricante usou-se o seguinte protocolo:

9,0 µl H₂O mili q

6,0 µl Tampão “Save money” (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5mM Cloreto de magnésio)

1,0 µl Oligonucleotídeo [KAN-2 RP-1(5 pmol) ou KAN-2 FP-1(5 pmol)]

2,0 µl “terminator ready reaction mix” (Big Dye)

2,0 µl DNA (Amplificado do PCR touchdown purificado)

20,0 µl

Precipitação da Reação PCR para seqüenciamento:

Para um de volume final de 20 µl da reação (após o PCR), foram adicionados 80 µl de isopropanol 75%, agitou-se levemente e incubada a reação por 15 min. a temperatura ambiente, e centrifugados por 45 min. a 4000 rpm desprezando logo o sobrenadante ao término do processo. Após este processo as amostras estiveram prontas para ser seqüenciadas.

Identificação do mutante

Com o seqüenciamento dos produtos de PCR touchdown dos mutantes analisados, foram usadas as seqüências obtidas para determinar o sítio de inserção do transposon, comparando estas seqüências com o banco de dados do seqüenciamento do DNA genômico e DNA plasmidial da bactéria fitopatogena *Xanthomonas citri* (<http://genoma4.iq.usp.br/xanthomonas>) usando o programa *BLAST N* (Altschul, et al., 1990). Procurou-se nas seqüências obtidas dos mutantes a região ME (Mosaic End; 5'AGATGTGTATAAGAGACAG 3') para determinar a posição exata do transposon no genoma.

3.7.7 Southern blot

Transferência

O DNA genômico dos mutantes randômicos de *Xanthomonas citri*, foram clivados usando algumas enzimas de restrição. Usaram-se as enzimas: *Pvu I*; *Xho I*; *Xba I*; *Hind III*; *Pst I*; *Sph I*; *Pvu I*; *Pst I* e *Ava I* seguindo as instruções do fabricante (New England Biolab). As reações de digestão foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%; e os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados através de um trans-iluminador UV. Os géis foram tratados com a solução de depuração (10 min), logo a solução de denaturação (30 min) e por último com a solução de neutralização (30 min). Montou-se um sistema de transferência (Sambrook et al., 1989), e foi colocada uma membrana de nylon (BIODYNE^R) na superfície do gel para fazer a transferência (blotting) com ajuda do tampão de transferência 6x SSC. Após a transferência, foi feito um “cross linking” do DNA à membrana por exposição à luz UV, com o intuito de se promover uma ligação covalente entre as moléculas de DNA e a membrana.

Marcação da Sonda

Usou-se no início como sonda o marcador de resistência a neomicina do vetor pUFR012, contudo posteriormente usou-se como sonda o amplificado por PCR da sequência de resistência a canamicina do transposon usando os oligonucleotídeos KAN-TNF e KAN-TNR.

Na marcação da sonda radioativa com P^{32} usando oligonucleotídeos randômicos (Feinberg and Vogelstein, 1983) usou-se 2,5 μ l DNA amplificado (~100 ng) e adicionado 2,5 μ l buffer TE pH 8,0 e a mistura denaturada em calor e conservada em gelo. misturou-se: Aos 5 μ l DNA denaturado foi adicionado 2 μ l dATP, 2 μ l dGTP, 2 μ l dTTP, 15 μ l “Random Primer Buffer” (Random primers DNA labeling system/GIBCO BRL.), 10 μ l [α - 32 P] dCTP (Amersham pharmacia biotech), 13 μ l H_2O milli Q e 1,0 μ l da enzima DNA pol I num volume final de 50 μ l e a reação incubada a 25 °C por 1 hora, em seguida finalizada a reação com 5,0 μ l de solução “stop”(EDTA 0,2M).

Hibridização

A membrana contendo o DNA transferido foi colocada em uma vasilha com 15 ml de solução de pré-hibridização (NaCl 1M; SDS 1%; Dextran 10%) e foi incubado a 65 °C por 3 horas. Em seguida, adicionou-se o DNA de esperma de salmão (450 μ l) e a sonda marcada radioativamente (50 μ l), previamente denaturadas. A reação de hibridização ocorreu de 10 a 14 hrs a uma temperatura de 65 °C. Após este processo, a membrana foi submetida a varias lavagens: uma com 150 ml da solução 1x SSC; 0,1% SDS à temperatura ambiente por 15 min., e 3 lavagens com 150 ml da solução 0,1x SSC; 0,1% SDS porém aquecida a 60 °C por 15 min. e por último, uma lavagem com água destilada finalizando com a secagem ao ar. A membrana foi então coberta com um filme plástico e colocada dentro de um cassette de exposição junto ao filme de Raio X., e exposto durante 48 horas a -80°C. Os filmes foram revelados com soluções de revelação da Kodak™.

Construção de mapas de restrição

Com o conhecimento do sítio de inserção do transposon no genoma da bactéria, se fez mapas de restrição virtual para alguns mutantes, e para este fim analisou-se

seqüências do genoma da bactéria de aprox. 10 kb em ambos sentidos (“upstream” e “downstream”) a partir do ponto de inserção do transposon. Estas seqüências foram alvos de clivagens teóricas usando o programa GEN RUNNER e foram selecionadas para o análise as enzimas de restrição usadas no “southern blot”.

3.7.8 Teste de Patogenicidade

Com os mutantes identificados pelos sítios de inserção do transposon no DNA genômico ou plasmidial das bactérias, foram feitos testes *in vivo*, para determinar se a ruptura de determinado gene afetava sua patogenicidade. As bactérias foram crescidas em meio de cultura líquida durante a noite 28 °C em agitação até obter uma OD₆₀₀ de 0,3 o que significa que as culturas se encontrariam em uma concentração de 1×10^8 células/ml. Nessa OD do crescimento bacterial, os mutantes foram inoculados nas folhas jovens das plantas de limão-cravo com ajuda de uma seringa plástica (Daniels et al., 1984a; Swarup et al., 1991; Gabriel et al., 1986) compreendendo uma área de infecção de aprox. 1 cm², e mantidas dentro de um laboratório sob condições de crescimento ambiental.

As inoculações foram feitas no tecido das folhas por duplicata (fig. 7), em um lado da folha foi inoculado a cepa selvagem (controle positivo) e no outro lado o mutante. O desenvolvimento dos sintomas foi avaliado a partir de 5 dias, 10 e 14 dias após a inoculação. Estes testes tiveram de 2 a 3 repetições em eventos diferentes.

Fig. 7. Diagrama do teste de patogenicidade dos mutantes em folhas de limão cravo

4. RESULTADOS

No início do trabalho, foi testado se a bactéria em cultura era verdadeiramente *Xanthomonas citri*, e para isso foi feito o teste de autenticidade usando a técnica de PCR com os oligonucleotídeos pTHA down e pTHA up que amplificam parte do gene de *pthA* (patogenicidade), específico de *Xanthomonas citri*. Posteriormente os produtos do PCR foram analisados por eletroforese em agarose 1% e corados com brometo de etídio e pode-se verificar a presença de fragmentos esperados de aproximadamente 800 bp (patogenicidade) Fig 8.

Fig 8. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação. As canaletas 1 e 2 mostram os amplificados usando os oligonucleotídeos PTHA UP e PTHA DOWN (gene de patogenicidade). A canaletas 1 pertence à amostra A e a canaleta 2 pertence à amostra B. As amostras A e B são preparados de DNA genômico de duas culturas de *Xanthomonas citri* que foram testadas. O marcador de peso molecular usado na eletroforese é o 1kb DNA ladder.

4.1 Produção de biblioteca de transposon

Foi gerada uma biblioteca de mutantes randômicos de *Xanthomonas citri* usando o Transposon EZ::TN <KAN-2> (Epicentre technologies) através da eletroporação do mesmo em *Xanthomonas citri*.

Como resultado da eletroporação obteve-se uma eficiência de transformação de 10^5 u.f.c/ μ l de transposon e foi feito um teste de viabilidade dos clones mutantes para determinar em quais condições seria melhor eles serem armazenados, comparando armazenagem em meio para congelar (2xTY-glicerol) a -80°C e armazenagem em água de torneira estéril (temperatura ambiente), obtendo-se os seguintes resultados quando repicamos os clones em meio sólido:

Na placa KLB agar/ Can⁵⁰ (da placa 96 pocinhos com meio para congelar): 95 colônias

Na placa KLB agar/ Can⁵⁰ (da placa 96 pocinhos com água autoclavada): 46 colônias.

A placa com meio para congelar tem melhores condições para a sobrevivência dos clones. As outras colônias que cresceram foram repicadas em várias placas de 96 pocinhos e mantidas a -80°C .

4.2 Isolamento de DNA genômico de *Xanthomonas citri* transformantes

Em tubos simples:

Na extração do DNA genômico usando o reagente DNazol em tubos simples a partir de uma cultura de 5 ml obteve-se uma grande produção de DNA nos isolamentos, e medições de absorbância mostraram concentrações de até 3,3 mg/ml de DNA genômico nos isolados. Além disso, foram feitos isolamentos a partir de 2 ml de cultura (miniprep) com ótimos resultados obtendo-se uma produção em média de 800 μ g/ml. (**fig. 9**).

Fig 9. Eletroforese em gel de agarose 1% de isolados de DNA genômico a partir de culturas de 2 ml. As amostras pertencem à biblioteca randômica # 1 de *Xanthomonas citri*. Marcador molecular 1kb DNA ladder

Em placas:

Com a metodologia usada conseguiu-se isolar DNA genômico em pequenos volumes(miniprep) mas com a vantagem de isolar um maior número de amostras (96).

Conseguiu-se melhorar a qualidade dos isolado tirando-se uma grande quantidade de impurezas como goma através da prévia lavagem do precipitado celular. Os isolados de DNA genômico mostraram concentrações em média de 780 µg/ml (fig. 10).

Fig 10. Eletroforese em gel de agarose 1% de 96 isolados de DNA genômico de culturas de 2 ml, observa-se que só o 10º tem rendimento baixo. (fileiras: 1-12; A1- A12/ 13-24; B1-B12/ 25-36; C1-C12/ 37-48; D1-D12/ 49-60; E1-E12/ 61-72; F1-F12/ 73-84; G1-G12/ 85-96; H1-H12). O marcador de peso molecular foi o 1kb DNA ladder.

4.3 Mapeamento dos Clones da Biblioteca de Transposon

A idéia para mapear estes clones foi amplificar um fragmento adjacente ao sítio de inserção do transposon usando uma metodologia chamada PCR touchdown , usando oligonucleotídeos semidegenerados e um oligonucleotídeo específico (fig 17).

O oligonucleotídeo específico hibridizaria somente na porção terminal do transposon inserido no genoma. Posteriormente usaria-se o seqüenciamento dos fragmentos para deduzir o sítio de inserção do transposon.

Teste com o oligonucleotídeo KAN-2 RP-1

Foi procurado um oligonucleotídeo específico para o PCR touchdown dos clones da biblioteca de transposição e uma opção foi usar um dos oligonucleotídeos KAN-2 RP-1 e KAN-2 FP-1 do kit EZ::TN<KAN-2>. Para termos certeza que os oligonucleotídeos eram específicos aos sítios de inserção foi feito um BlastN das seqüências dos oligonucleotídeos KAN-2 RP-1 e KAN-2 FP-1 (Epicentre technologies) contra o banco de dados de *Xanthomonas citri*, e como resultado obteve-se que as seqüências destes oligonucleotídeos não alinhavam-se em nenhum lugar do genoma da bactéria. Assim utilizamos inicialmente a sequência do oligonucleotídeo KAN-2 RP-1.

Testou-se o método usando o oligonucleotídeo KAN-2 RP-1 e os oligonucleotídeos semidegenerados, usando os clones **IA2** e **IA3**. Depois da eletroforese em agarose 1% dos produtos do PCR touchdown obteve-se resultados muito interessantes, sendo que em algumas amostras que tinham o oligonucleotídeo APYBAF1 só apareceram uma banda e em amostras com o oligonucleotídeo HIB17 pode-se ver que foram gerados varios amplificadores, mas sempre um deles com maior intensidade que as outras bandas. Além disso, a intensidade dos amplificadores foi maior de forma proporcional às concentrações dos oligonucleotídeos semidegenerados. (**fig.11**).

Observamos que o oligonucleotídeo HIB17 apresentava um número maior de bandas, muito provavelmente devido a seu tamanho, 25 bp. e por ser semidegenerado, tem facilidade de alinhar-se em maior número de regiões do DNA genômico em comparação com o oligonucleotídeo APYBAF1, que tem 43 bp e que consegue-se alinhar

em menos regiões sendo específico na produção do amplificado nas condições do PCR touchdown.

Fig 11. Resultados do PCR touchdown em géis de agarose 1%; 90 volts; 1hr. (A) *Amplificados gerados a partir do DNA genômico do clone IA2*, pode-se observar que as bandas com maior intensidade nas fileiras 5 e 6 que representam as combinações de oligonucleotídeos de 10 pmol KAN-2 RP-1 com 50 e 100 pmol de HIB17 respectivamente. As fileiras 2 e 3 mostram amplificados muito fracos como produto da combinação 10 pmol de KAN-2 RP-1 com 50 e 100 pmol de APYBAF1 respectivamente. Nas fileiras 11 e 12 obteve-se amplificados muito fortes, sendo as concentrações dos oligonucleotídeos 20 pmol de KAN-2 RP-1 com 50 e 100 de HIB17 respectivamente. As fileiras 8 e 9 mostram também amplificados fracos usando as combinações 20 pmol de KAN-2 RP-1 com 50 e 100 pmol do oligonucleotídeo APYBAF1. Assim mesmo observa-se nas fileiras 1; 4; 7 e 10 nenhum amplificado quando foram usados os oligonucleotídeos semidegenerados na concentração de 10 pmol (B) *Amplificação gerados a partir do clone IA3*, os resultados são algo similares aos obtidos com o clone IA2, e observa-se amplificados nas fileiras 2 e 3 como produto da combinação de 10 pmol de KAN-2 RP-1 com 50 e 100 pmol do oligonucleotídeo APYBAF1 respectivamente. Nas fileiras 5 e 6 mostram os resultados da combinação de 10 pmol de KAN-2 RP-1 com 50 e 100 pmol de HIB17, e nas fileiras 11 e 12 mostram amplificados produto da combinação de 20 pmol de KAN-2 RP-1 com 50 e 100 pmol HIB17 respectivamente. Entretanto nas fileiras 8 e 9 não se observa amplificados o que sugere que houve um problema com um dos reagentes, assim mesmo nas fileiras 1; 4; 7 e 10 não se observa amplificados quando os oligonucleotídeos semidegenerados foram usados na concentração de 10 pmol. Como controles do PCR touchdown foram feitas três reações por separado usando somente um oligonucleotídeo por reação, sendo C1(KAN-2 RP-1) C2 (APYBAF1) e C3 (HIB17). Os dois primeiros controles não conseguiram amplificar, e o controle C3 utilizando o oligonucleotídeo HIB17 somente gerou bandas de aproximadamente. 1,1; 1,4 e 1,8 Kb (esta última mais intensa).

4.4 Otimização do PCR touchdown

Observou-se que para alguns mutantes as condições originalmente testadas não amplificavam nenhum produto, o que sugeria que os parâmetros de ciclagem precisavam ser otimizados para aumentar o número de amostras amplificadas. Assim foram testadas as seguintes condições:

CONDIÇÃO 1 :

Usou-se o oligonucleotídeo específico KAN-2 FP-1 (20 pmol) em combinação com o oligonucleotídeo HIB17 (100 pmol), e o oligonucleotídeo específico em combinação com o oligonucleotídeo APYBAF1 (100 pmol) nas seguintes condições: passo inicial de 95 °C/ 5 min, com uma primeira ciclagem de 95 °C/ 30 seg., 60°C/ 30 seg. (decrecendo -0,5 °C/ciclo), 72 °C/ 1 min. por 30 ciclos. Uma segunda ciclagem de 95 °C/ 30 seg., 45 °C/ 30 seg., 72 °C/ 1 min., por 10 ciclos.

Fig. 12 Gel de eletroforese 1%, mostrando a baixa amplificação desta condição para alguns mutantes. Nesta condição foram testados 6 clones da biblioteca randômica 1: **clone IB1** (fileiras 1-2); **clone IB2** (fileiras 3-4); **clone IB3** (fileiras 5-6); **clone IC1** (fileiras 7-8); **clone IC2** (fileiras 9-10); **clone IC3** (fileiras 11-12). As fileiras com número ímpar mostram os resultados de utilizar os oligonucleotídeos KAN-2 FP-1 + APYBAF1 e as fileiras com números par mostram os resultados de utilizar KAN-2 FP-1 + HIB17.

Observa-se que só obtivemos um amplificado forte na amostra do **clone IC2** usando o oligonucleotídeo semidegenerado HIB17; e usando o APYBAF1 não ocorreu amplificação. Nas outras amostras apareceram amplificações muito fracas e outras sem amplificar, obtendo-se nesta condição um rendimento de 17% (**fig. 12**).

CONDIÇÃO 2

Foram usados os oligonucleotídeos KAN-2 FP-1 (20 pmol) e HIB17 (100 pmol) nas seguintes condições: com passo inicial de 95 °C/ 5 min. com uma primeira ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 60 °C/ 45 seg. (decrecendo -0,5 °C/ciclo), 72 °C/ 2 min. por 25 ciclos. Uma segunda ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 50 °C/ 45 seg., 72 °C/ 2 min., por 25 ciclos.

Fig. 13 Gel de eletroforese 1%, mostrando que nesta condição de parâmetros obteve-se melhores resultados. Nas canaletas do gel mostram-se os produtos do PCR touchdown de clones da biblioteca randômica I: **clone IG1** (1), **clone IG2** (2), **clone IG3** (3), **clone IG4** (4), **clone IG5** (5), **clone IG6** (6), **clone IG7** (7), **clone IG8** (8), **clone IG9** (9), **clone IG10** (10), **clone IG11** (11), **clone IG12** (12), **clone IE1** (13), **clone IG1** (14), **clone IH3** (15). Marcador 1kb DNA ladder.

Nesta condição os resultados foram melhores obtendo-se um maior número de amostras amplificadas (87%) (**fig. 13**) usando como oligonucleotídeo semidegenerado o HIB17. O aumento da temperatura de anelamento da segunda rodada e o número de ciclos gerou melhores resultados. As amostras de DNA usadas pertencem à biblioteca randômica I.

CONDIÇÃO 3

Usou-se o oligonucleotídeo KAN-2 FP-1 (20 pmol) com passo inicial de 95 °C/ 5 min. com uma primeira ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 65 °C/ 30 seg., 72 °C/ 1 min. por 20 ciclos. Adicionou-se o oligonucleotídeo HIB17 e uma segunda ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 60 °C/ 30 seg. (decrecendo -0,5 °C/ciclo), 72 °C/ 1 min., por 30 ciclos. e uma terceira ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 45 °C/ 30 seg., 72 °C/ 1 min., por 10 ciclos. Os resultados obtidos nesta condição estão mostrados na **fig.14**.

CONDIÇÃO 4

Usou-se o oligonucleotídeo KAN-2 FP-1 (20 pmol) e o oligonucleotídeo HIB17 (100 pmol) nas seguintes condições: com passo inicial de 95 °C/ 5 min. com uma primeira ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 60 °C/ 30 seg. (decrecendo -0,5 °C/ ciclo), 72 °C/ 1

min. por 25 ciclos. Uma segunda ciclagem de 95 °C/ 45 seg., 50 °C/ 30 seg., 72 °C/ 1 min., por 25 ciclos. Os resultados estão mostrados na **fig. 15**.

Fig. 14 Gel de eletroforese 1% mostrando os resultados do PCR touchdown nesta condição, com amplificados algo fracos. Mostra-se nas canaletas: **clone IIB1** (1), **clone IIB4** (2), **clone IIB11** (3), **clone IIC7** (4). Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder

Fig. 15 Gel de eletroforese 1% mostrando amplificados obtidos usando o PCR touchdown com estes parâmetros. Nas canaletas encontra-se: **clone IIB1** (1), **clone IIB4** (2), **clone IIB11** (3), **clone IIC7** (4). Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder

Comparando as duas condições do PCR touchdown (3) e (4) usando como amostras quatro clones da biblioteca randômica 2 : **clone IIB1**(1); **clone IIB4**(2); **clone IIB11**(3); **clone IIC7**(4), observamos que em ambas condições conseguiu-se obter amplificados, sendo que na condição (4) os produtos do PCR foram mais fortes (**fig. 15**) em comparação com a condição (3) que formou amplificados fracos, mas ainda assim, também consegue-se obter produtos amplificados usando esta variante (**fig. 14**). A condição (4) é similar à condição (2) só que há diferença no tempo de extensão e de anelamento, sendo que os outros parâmetros de ciclagem são os mesmos obtendo-se bons resultados nas amplificações, no entanto não se descarta a validade da condição (3), mas a pequena desvantagem desta condição é o uso de duas cargas de enzima Taq polimerase, mas ainda assim esta condição é também uma boa alternativa se tiver problemas de amplificação usando a condição (4).

4.5 Teste de eficiência dos oligonucleotídeos semidegenerados

Foram testados os oligonucleotídeos semidegenerados APYBAF1 e HIB17 junto com o oligonucleotídeo específico KAN-2 FP-1 para determinar a eficiência destes oligonucleotídeos usando a condição (2) no PCR touchdown.

Os alvos do teste foram isolados de DNA genômico de clones mutantes da biblioteca randômica 2, usando o mesmo protocolo de reação PCR dos outros testes. O resultado obtido mostra que nas mesmas condições, quando foi utilizada a combinação KAN-2 FP-1 + HIB17 (**fig. 16A**) obteve-se uma produção de amplificados de 100%, no entanto usando a combinação KAN-2 FP-1 + APYBAF1(**fig. 16B**) obteve-se uma produção de 58%.

Com este resultado consegue-se determinar a combinação de oligonucleotídeos que otimizam o PCR touchdown na condição testada. Sendo que a condição ideal para o PCR touchdown seria a número 4, com 25 ciclos na primeira rodada onde vai diminuindo a temperatura ciclo a ciclo a partir de 60 °C e uma segunda rodada com 25 ciclos e uma temperatura de anelamento de 50 °C e 1 minuto de extensão.

Fig 16. Comparação de eficiência dos oligonucleotídeos semidegenerados no PCR touchdown com varios clones. (A) Produtos de amplificação usando os oligonucleotídeos KAN-2 FP-1 + HIB17. (B) Produtos de amplificação usando os oligonucleotídeos KAN-2 FP-1 + APYBAF1. Observa-se que nesta combinação se obteve um número menor de amplificações, mas com maior especificidade não. As amostras usadas são dos clones: IA1 (1) a IA12 (12). O marcador usado nos géis de eletroforese é o 1 Kb DNA ladder.

4.6 Identificação dos mutantes

Com a metodologia do PCR touchdown otimizada, conseguiu-se obter amplificados que contêm seqüências que pertencem ao transposon e seqüências adjacentes do DNA genômico da bactéria (fig. 17). Assim os fragmentos purificados foram seqüenciados e as seqüências obtidas foram submetidas a análises deduzindo a posição e sentido de inserção do transposon no genoma da bactéria. Esta análise baseou-se na localização da seqüência dos extremos do transposon chamado ME (“Mosaic End”) que tem a seguinte seqüência: 5’ AGATGTGTATAAGAGACAG 3’.

Fig 17. Mostra-se o modelo de geração dos amplificados. Usou-se o mesmo oligonucleotídeo específico (azul) usado no PCR touchdown para o seqüenciamento. Em cada seqüenciamento bom conseguiu-se achar esta seqüência ME.

Assim no caso do **clone IIA11** foi obtida a seguinte seqüência:

Seqüenciamento do Produto do PCR touchdown do clone IIA11:

```
GNGGCGGGCATCTCTACAGTCANNCTGCAGGCATGCAAGCTTCAGGGTTGAGATGTGTAT
AAGAGACAGGGGCCAGCCGTTGCGCCTGGCATTGCGCAGCCAGGCCTTGCACTTTTTCGA
TCCAGCCACCGGGCAGCGGCTGGAGGCCGCGTAGGCCGACTGGTCAAACAGCGACGCCGC
CAGACGGGCACGGCGGGCGTTTCGGAATCGGTGGGTGTCGCTTTGTCACTGAGGTGCTGCA
CGACGTCGACGCCCCGCCTGGCACGGCTCGCGACGGTTTTTCGCTGCTAGCGCTCCAGCCCCG
TCGTAAGTGCGCGCGGCCCGGGCGCCATGCCTGCCCGCCTGCAACGCGGTACCGGCGTCCA
GCGTCAACTCCAACGGCAATACCGCCAGCGCAAGGTTCCCGGCCACGCTCACCCTGTGC
CGATCGCGCTACCGTCCAACGCGACGGCATCGCCTGCATCCACGGCAGCATCGGTTTCCAG
CAACTGCAACGCGCGCTTGGCCTTGCCAGGAAGTGCCTCCGCGCCACGATTTCCTGGCCC
GGGTAGCAGCCTTTCTTGACGCTGTACGCCTGCAGGCGGTCCAGTGCCAAGTGTGCGGCG
TCCATTGTTCGCGCTGGCCCTCGACCAGGCGGGCGAGCCCCAGTTGCAGAATCGGTGCTCC
GCCACTGCGCATCTGCACTCGGCAGTTCGATAGGCGTCGCCAATGCATCCGCGCTGTAAAG
CAATAACGTGCGCGGCAGCGCGGTGCTGCCANATCCCCTCAAANNCCNGGANTTNCGG
```

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
>X. citri V3.0		<u>1346</u>	0.0
Length = 5175554 Score = 1346 bits (679), Expect = 0.0 Identities = 691/694 (99%), Gaps = 1/694 (0%) Strand = Plus / Plus		Fig 18	
Query: 70	gggccagccgttgccgctggcattgcgagccagcccttgcaacttttcgatccagccac	129	
Sbjct: 2422197	gggccagccgttgccgctggcattgcgagccagcccttgcaacttttcgatccagccac		2422256
Query: 130	cgggcagcggctggagggccgctagggcgactgggtcaaacagcgacgccgccagacgggc	189	
Sbjct: 2422257	cgggcagcggctggagggccgctagggcgactgggtcaaacagcgacgccgccagacgggc		2422316
Query: 190	acggcgggcggttcggaatcggtgggtgtcgctttgtcactgaggtgctgcacgacgtcga	249	
Sbjct: 2422317	acggcgggcggttcggaatcggtgggtgtcgctttgtcactgaggtgctgcacgacgtcga		2422376
Query: 250	cgccccgctggcagcgctcgcgacgggttttcgctgctagcgctccagccccgctgtaagt	309	
Sbjct: 2422377	cgccccgctggcagcgctcgcgacgggttttcgctgctagcgctccagccccgctgtaagt		2422436
Query: 310	gcgcgcggccggggcgccatgcctgccccgctgcaacgcggtaccggcgctccagcgtaac	369	
Sbjct: 2422437	gcgcgcggccggggcgccatgcctgccccgctgcaacgcggtaccggcgctccagcgtaac		2422496
Query: 370	tccaacggcaataaccgccagcgcaaggttcccgccacgctcaccactgtgccgatcgcg	429	
Sbjct: 2422497	tccaacggcaataaccgccagcgcaaggttcccgccacgctcaccactgtgccgatcgcg		2422556
Query: 430	ctaccgtccaacgcgacggcatcgctgcatccacggcagcatcggtttccagcaactgc	489	
Sbjct: 2422557	ctaccgtccaacgcgacggcatcgctgcatccacggcagcatcggtttccagcaactgc		2422616
Query: 490	aacgcgcgcttgcccttgcccaggaagtgcgtccgcgccacgatttctggccccgggtag	549	
Sbjct: 2422617	aacgcgcgcttgcccttgcccaggaagtgcgtccgcgccacgatttctggccccgggtag		2422676
Query: 550	cagcctttcttgacgctgtacgcctgcaggcgggtccagtgccaaactgctgcggcgctccat	609	
Sbjct: 2422677	cagcctttcttgacgctgtacgcctgcaggcgggtccagtgccaaactgctgcggcgctccat		2422736
Query: 610	tgttcgcgctggccctcgaccaggcggggcgagccccagttgcagaatcggtcgtccgcca	669	
Sbjct: 2422737	tgttcgcgctggccctcgaccaggcggggcgagccccagttgcag-atcggtcgtccgcca		2422795
Query: 670	ctgcgcactctgcaactcggcagttcgataggcgctgccaatgcacccgcgctgtaaagcaa	729	
Sbjct: 2422796	ctgcgcactctgcaactcggcagttcgataggcgctgccaatgcacccgcgctgtagagcaa		2422855
Query: 730	taacgtgcgcggcagcgcggtgctgcccanaatcc	763	
Sbjct: 2422856	taacgtgcgcggcagcgcggtgctgcccagatcc		2422889

Fig 18. Resultados do alinhamento de seqüências obtidas usando PCR touchdown do clone IIA11 com seqüências do genoma da bactéria *Xanthomonas citri*.

A região ME foi identificada nas seqüências obtidas deste clone e por Blast N contra a base de dados do projeto genoma de *Xanthomonas citri*, obteve-se o seguinte resultado de alinhamento, com um “score” ótimo de alinhamento e com similaridade de 99% (fig. 18).

Com este resultado do BlastN (fig. 18) se deduziu que o transposon estava inserido na posição 2 422 197 do genoma, o qual alinha a partir da posição 70 do seqüenciamento do amplificado do **clone IIA11**, e analisando estas seqüências foi identificada a região ME do transposon que chega até a posição 69 deste seqüenciamento, concluindo que a partir da posição 70 temos as seqüências, que pertencem ao genoma da bactéria. Além disso para conhecer se o sítio de inserção do transposon esta numa ORF precisou-se da ajuda da ferramenta GeneMap (<http://genoma4.iq.usp.br/xanthomonas>).

No caso do **clone IA2** o lugar de inserção foi na posição 1 219 362; nessa posição não foi quebrada nenhuma ORF, e esta posição se encontra entre a ORF 25094.1 (Proteína hipotética conservada) e a ORF 25716.1 (Proteína hipotética), baseado nos seguintes dados:

Clone IA2

(Seqüências do amplificado por PCR touchdown)

Alinhamento: Query: 70 ----- 631
Sbjct: 1 219 362-----1 219 922

No caso do **clone IA3** o lugar de inserção foi na posição **2 839 198**; nessa posição também não foi quebrada nenhuma ORF; localizando-se entre as ORF 25756.1 e ORF 25191.1.

Clone IA3

(Seqüências do amplificado por PCR touchdown)

Alinhamento : Query 183----- 627
 Sbjct:2 839 080-----2 838 640

A posição 65 da seqüência é onde começa o genoma porque até a posição 64 pertence à seqüência do transposon (região ME de pos. 46 a pos. 64).

Assim o procedimento para a identificação dos mutantes randômicos está representado no seguinte esquema (fig. 19):

Fig. 19. Fluxograma do processo de identificação de mutantes randômicos

E usando esta metodologia foi possível identificar 90 mutantes randômicos, dos 144 mutantes que foram testados, sendo os mutantes identificados mostrados nas tabelas: 4; 5; 6 e 7.

TABELA 4: Identificação de Mutantes randômicos de *Xanthomonas citri*

Clone	Posição de inserção do Transposon no genoma	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
I A 2	1 219 362	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25094.1 e 25716.1
I A 3	2 839 198	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25756.1 e 25191.1
I A 6	861 594	Gene 5125.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
I A 8	3 975 819	Gene 1584.1 Categoria: (V.A.1/)	Proteína simporte de proton-glutamato
I A 9	3 100 578	Gene 25785.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
I A 12	4 238 225	Gene 3105.1 Categoria: (III.A.4/)	Sistema de reparo do DNA específico para DNA alquilado
I B 1	3 819 866	Gene 25208.1 Categoria: (IV.D/)	Fimbrilina
I B 2	5 064 334	Gene 6688.1 Categoria: (III.A.4/)	Formamidopirimidina DNA glicosilase
I B 10	4 717 660	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 2811.1 e 15127.1
I B 12	5 114 462	Gene 25788.1 Categoria: (I.A.2/)	Uréia amidoliase
I C 1	54 410	Gene 25437.1 Categoria: (IV.C/)	Proteína de biosíntese de lipopolissacarídeos
I C 2	15 776	Gene 5409.1 Categoria: (II.E/)	Cardiolipina sintetase
I C 3	539 400	Gene 560.1 Categoria: (V.A.1/)	Transportador de di-tripeptídeo
I D 1	1 183 304	Gene 3369.1 Categoria: (III.D.2/)	Fosfolipase C não-hemolítica
I D 2	4 965 340	Gene 25100.1 Categoria: (II.A.4/)	Shiquimato quinase
I D 3	3 844 759	Gene 25284.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
I E 3	3 012 697	Gene 4236.1 Categoria: (III.A.4/)	Adenina glicosilase A/G-específico
I E 5	4 040 666	Gene 2138.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
I E 6	2 625 108	Gene 25545.1 Categoria: (VI.B/VII.B)	Proteína relacionada ao plasmídeo
I E 7	570 461	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 11460.1 e 11459.1
I E 9	1 086 971	Gene 25313.1 Categoria: (I.B.10/I.C.1)	Piridina nucleotídeo transhidrogenase, subunidade beta
I E 10	3 082 427	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 4335.1.1 e 4337.1
I F 1	3 651 536	Gene 4574.1 Categoria: (III.A.1/)	Helicase dependente de ATP

TABELA 5: Identificação de Mutantes randômicos de *Xanthomonas citri*

Clone	Posição de inserção do Transposon no genoma	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
I F 2	4 386 170	Gene 1445.1 Categoria: (I.C.3/)	Óxidoredutase
I F 3	22 519 (pXac 33)	Gene 46530.1 Categoria: (VI.C/III.A.3)	Transposase Tn5045
I F 5	4 143 842	Gene 2261.1 Categoria: (I.A.1/)	Ramnogalacturonase B
I F 6	1 385 695	Gene 5904.1 Categoria: (VII.C/VII.G)	Catalase
I F 7	1 385 695	Gene 5904.1 Categoria: (VII.C/VII.G)	Catalase
I F 8	2 942 590	Gene 175.1.1 Categoria: (VII.H/III.B.4)	Queuine tRNA-ribosiltransferase
I F 9	4 581 713	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 19502.1 e 1123.1
I F 10	50 245 (pXac 66)	Gene 10163.2 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
I F 12	31 211	Gene 5383.1 Categoria: (VII.D/I.A.1)	Celulase
I G 1	20 149 (pXac 33)	Gene 49540.1 Categoria: (VI.C/)	Transposase
I G 2	4 384 180	Gene 1440.1 Categoria: (I.D.2/)	Regulador transcricional
I G 3	2 911 881	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 973.1 e 972.1
I G 4	25778 (pXac 66)	Gene 10257.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
I G 6	2 673 689	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25523.1 e 25522.1
I G 7	4 454 066	Gene 25266.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
I G 8	3 590 170	Gene 6356.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
I G 9	2 644 976	Gene 25862.1 Categoria: (VI.B/)	Proteína relacionada ao plasmídeo
I G 10	3 971 946	Gene 1579.1 Categoria: (III.C.3/)	Prolina imino-peptidase
I G 11	4 415 366	Gene 1492.1 Categoria: (II.A.2/II.B.11/)	UDP-glicose 4-epimerase
I H 1	2 902 074	Gene 15052.1 Categoria: (VIII.C/)	Proteína hipotética conservada de <i>Xanthomonas</i>
I H 3	2 900 815	Gene 812.1 Categoria: (II.A.2/)	Omega-aminoacido-piruvato aminotransferase
I H 5	539 400	Gene 560.1 Categoria: (V.A.1/)	Transportador de di-tripeptídeo
I H 10	1 208 226	Gene 3405.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada

TABELA 6 : Identificação de Mutantes randômicos de *Xanthomonas citri*

Clone	Posição de inserção do Transposon no genoma	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
I H 12	3 800 540	Gene 46020.2 Categoria: (VI.C/)	Transposase Tn5044
II A 1	14 515 (pXac 66)	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 46551.2 e 100.1
II A 2	4 578 981	Gene 19501.1	RNA Ribossomal
II A 4	71 522	Gene 25010.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
II A 6	233 449	Gene 7646.1 Categoria: (I.C.3/)	Indolpiruvato ferredoxina óxidoredutase, cadeia alfa
II A 8	4 652 613	Gene 7023.1 Categoria: (III.D.3/)	Lipoproteína Blc da membrana externa
II A 9	3 582 759	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25632.1 e 6341.1
II A 10	796 661	Gene 5046.1 Categoria: (I.D.2/)	Regulador transcricional
II A 11	2 422 197	Gene 6947.1 Categoria: (V.A.3/)	Proteína ligante de ATP do transportador ABC de açúcar
II A 12	3 301 433	Gene 1689.1 Categoria: (III.B.5/)	RNA helicase dependente de ATP
II B 1	532 491	Gene 568.1 Categoria: (I.C.6/)	Piruvato desidrogenase E1 subunidade alfa
II B 2	2 015 751	Gene 3467.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
II B 3	5 028 817	Gene 1357.1 Categoria: (I.A.1/VII.D)	Xilosidase/arabinosidase
II B 4	1 992 362	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 3510.1 e 3509.1
II B 6	1 391 056	Gene 5901.1 Categoria: (I.A.2/I.B.10)	Glicina decarboxilase
II B 8	333 919	Gene 7490.1 Categoria: (VIII.A)	Proteína hipotética conservada
II B 9	2 410 664	Gene 6933.1 Categoria: (V.A.7/)	Proteína de transporte
II B 10	4 326 019	Gene 25125.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
II B 11	3 645 748	Gene 4581.1 Categoria: (IV.D/V.C)	Proteína do pilus
II B 12	4 242 735	Gene 3110.1 Categoria: (IV.A.1)	Proteína IpsJ
II C 1	4 459 379	Gene 2944.1 Categoria: (IV.C/)	Lauril aciltransferase para biosíntese do lipídeo A
II C 2	5 053 981	Gene 6699.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
II C 3	2 883 395	Gene 783.1 Categoria: (VII.C/V.A.7)	Proteína de transporte

TABELA 7 : Identificação de Mutantes randômicos de *Xanthomonas citri*

Clone	Posição de inserção do Transposon no genoma	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
II C 4	163 132	Gene 3664.1 Categoria: (I.D.2/IX)	Regulador transcricional
II C 5	2 537 585	Gene 7276.1 Categoria: (I.D.1/)	Sistema de dois componentes, proteína sensora
II C 6	3 645 748	Gene 4581.1 Categoria: (IV.D/IV.C)	Proteína do pilus
II C 7	3 820 996	Gene 2032.1 Categoria: (IV.D/)	Proteína de montagem da fimbria
II C 8	5 959 041	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25101.1 e 606.1
II C 9	2 537 585	Gene 7276.1 Categoria: (I.D.1/)	Sistema de dois componentes, proteína sensora
II C 10	2 802 797	Gene 1980.1 Categoria: (III.A.4//)	Proteína MutL para reparo de DNA "mismatch"
II C 11	3 645 748	Gene 4581.1 Categoria: (IV.D/IV.C)	Proteína do pilus
II C 12	1 250 008	Gene 394.1 Categoria: (II.D.4/)	Proteína A da biosíntese do cofator molibdênio
II D 1	4 471 861	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 2926.1 e 2923.1
II D 2	19 355 (pXac 33)	Gene 49520.1 Categoria: (VI.C/III.A.3)	Transposase
II D 3	1 668 224	Gene 4834.1 Categoria: (VII.C/V.A.7)	Bomba de fluxo para resistência a drogas
II D 5	50 260 (pXac 66)	Gene 10163.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
II D 6	3 800 363	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25806.1 e 46020.1
II D 7	214 169	Gene 7670.1 Categoria: (II.D.4/)	Fenilalanina hidroxilase
II D 8	49 591 (pXac 66)	Gene 162.2 Categoria: (VI.B/III.A.1)	Proteína de replicação A
II D 9	64 865 (pXac 66)	Gene 10322.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
II D 10	3 979 556	Gene 1589.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
II D 11	863 777	Gene 5131.1 Categoria: (I.C.3/)	Citocromo C4
II D 12	4 354 921	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 973.1 e 972.1
XI H 12	2 179 435	Gene 2372.1 Categoria: (VII.H/I.D.1)	Proteína RpfC

OBS: Os mutantes que contêm inserções nos plasmídeos estão identificados por: (pXac 33) e (pXac 66), na coluna de posições.

Usando esta metodologia de mapeamento de mutantes conseguiu-se mapear 90 mutantes, e análises dos dados de sítios de inserção do transposon no genoma mostrou que alguns clones contêm o transposon inserido na mesma posição o que indicaria supostos “hot spot”, assim observou-se que os clones: **IIC6**, **IIC11**, e **IIB11** tem uma disrupção gênica na posição **3 645 748**; os clones **IH5**, e **IC3** tem a disrupção gênica na posição **539 400**; os mutantes **IF6** e **IF7** tem a sua disrupção gênica na posição **1 385 695**. Estas redundâncias dos sítios de inserção representaram o 4,4% do total de mutantes identificados.

Observamos que o 83,3% dos mutantes apresentaram disrupção gênica e o restante (16,7%) tinha a inserção do transposon nas regiões intergênicas. No mapeamento de mutantes foi interessante também identificar aqueles que tem nocauteados genes com função desconhecida sendo: 10 ORFs com a categoria **VIII.A** (Proteína hipotética conservada) e 7 ORFs com a categoria **VIII.B** (Proteína hipotética). Os mutantes identificados foram arranjados de acordo à categoria que pertencem o seu gene nocauteado, e pode-se ver os resultados na figura 20.

Fig 20. Arranjo de mutantes randômicos identificados de acordo à categoria de seus genes nocauteados: **Categoria I:** metabolismo intermediário; **categoria II:** biossíntese de pequenas moléculas; **categoria III:** metabolismo de macromoléculas; **categoria IV:** estrutura celular; **categoria V:** processos celulares; **categoria VI:** elementos genéticos móveis; **categoria VII:** patogenicidade, virulência e adaptação; **categoria VIII:** hipotéticas.

No caso dos mutantes com disrupção em regiões intergênicas, foi de nosso interesse avaliar o efeito desta inserção em um ou vários genes quando se encontra inserido no meio de um operon como foi o caso do **clone IE10**, ou quando se encontra inserido o transposon na região promotora de um gene como foi o caso do **clone IIA1**.

4.7 Southern blot e construção de mapas de restrição dos mutantes

Usou-se esta ferramenta para confirmar que o transposon estava inserido no local correto do genoma. Além disso foi importante a construção de mapas de restrição para alguns mutantes usando o programa GENE RUNNER. Usou-se para a análise várias enzimas e os fragmentos obtidos das análises foram comparados com os resultados obtidos no Southern blot com o qual confirmaram os dados de identificação dos mutantes obtidos pelo seqüenciamento. No southern blot foram usados como sondas o gene de resistência a Neomicina (1,3 kb) obtido do plasmídeo pUFR012 por digestão com enzimas, e posteriormente usou-se um fragmento amplificado (1,1 kb) do mesmo transposon EZ::TN<KAN-2> com oligonucleotídeos desenhados para esse fim. (fig. 21)

Fig 21 Obtenção do fragmento de DNA obtido a partir do gene de canamicina do transposon usando os oligonucleotídeos TNKAN-R e TNKAN-F com o tamanho de aprox 1,1 Kb.

Foram escolhidos 6 clones para esta confirmação : **Clone IIB11** (fig. 21) ; **clone IID11** (fig. 22); **clone IB1** (fig. 23) ; **clone IF7** (fig. 24); **clone IA9** (fig. 25); **clone IC2** (fig. 26) Com os dois primeiros clones (**IIB11**, **IID11**) usou-se como sonda o fragmento do gene de Neomicina do vetor pUFR012 obtido por digestão, e nos outros quatro clones (**IA9**, **IB1**, **IC2**, **IF7**) usou-se como sonda o gene de Canamicina obtido do transposon.

Os mapas de restrição mostraram, em cada um dos clones avaliados que os fragmentos obtidos no southern blot casam com os fragmentos esperados teoricamente, gerados pela análise de restrição feita pelo programa GENE RUNNER, confirmando os sítios de inserção do transposon usando a metodologia de mapeamento desenvolvida. Os mapas construídos encontra-se a seguir nas figuras 21 a 26.

FIG 21

A

Análise de restrição teórico usando o programa GEN RUNNER. Analisou-se os sítios de clivagem e determinou-se os fragmentos esperados para 3 enzimas., nas regiões "upstream e downstream" do sítio de inserção do transposon no genoma do mutante.

B

Autoradiografia de raios X de transferência southern e hibridização das amostras de DNAG do clone IIB11 de *Xanthomonas citri*, digeridos com as enzimas *Pvu I* (1); *Pst I* (2) e *Ava I* (3), e foram detectados os fragmentos de 2,13 Kb e 1,9 Kb (*Pvu I*); 2,15 Kb e 2,14 Kb (*Pst I*); 2,0 Kb e 1,1 Kb (*Ava I*). Estes resultados concordam com os fragmentos esperados dos análises de restrição.

Dados do mutante IIB11:

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene quebrado	Produto do gene quebrado
IIB 11	3 645 746	Gene 4581.1 (IV.D/ V.C) (3645841 - 3645443)	Pilus protein

FIG 22

A

Análise de restrição teórico usando o programa GEN RUNNER. Analisou-se os sítios de clivagem e determinou-se os fragmentos esperados para 3 enzimas, nas regiões “upstream e downstream” do sítio de inserção do transposon no genoma do mutante.

1 2 3

B Autoradiografia de raios X de transferência southern e hibridização das amostras de DNAG do clone IID11 de *Xanthomonas citri*, digeridos com as enzimas *Pvu I* (1); *Pst I* (2) e *Ava I* (3), e foram detectados os fragmentos de 3,1 Kb e 0,7 Kb (*Pvu I*); 2,1 Kb (*Pst I*); 2,3 Kb e 1,1 Kb (*Ava I*). Estos resultados concordam com os fragmentos esperados dos análises de restrição.

Dados do mutante IID11:

Clone	Posição de Inserção do Transposon	Gene quebrado	Produto do gene quebrado
IID 11	863 777	Gene 5131.1 (i.C.3) (964285 - 863548)	Cytochrome C4

FIG 23

A Análise de restrição teórico usando o programa GEN RUNNER. Analisou-se os sítios de clivagem e determinou-se os fragmentos esperados para 3 enzimas, nas regiões “upstream e downstream” do sítio de inserção do transposon no genoma do mutante.

1 2 3

B Autoradiografia de raios X de transferência southern e hibridização das amostras de DNAG do clone IB1 de *Xanthomonas citri*, digeridos com as enzimas *Pvu I* (1); *Pst I* (2) e *Ava I* (3), e foram detectados os fragmentos de 3,0 Kb e 2,7 kb (*Pvu I*); 4,1 Kb (*Pst I*); 1,5 Kb e 0,2 Kb (*Ava I*). Estos resultados concordam com os fragmentos esperados dos análises de restrição.

Dados do mutante IB1:

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene quebrado	Produto do gene quebrado
IB 1	3 819 866	Gene 25208.1 (V.D/) (3820050 - 3819613)	Fimbrilin

FIG 24

A Análise de restrição teórico usando o programa GEN RUNNER. Analisou-se os sítios de clivagem e determinou-se os fragmentos esperados para 3 enzimas, nas regiões upstream e downstream do sítio de inserção do transposon no genoma do mutante.

B Autoradiografia de raios X de transferência southern e hibridização das amostras de DNAG do clone IF7 de *Xanthomonas citri*, digeridos com as enzimas *Pvu I* (1); *Pst I* (2) e *Ava I* (3), e foram detectados os fragmentos de 1,5 Kb e 0,5 Kb (*Pvu I*); 3,2 Kb (*Pst I*); 4,4 Kb (*Ava I*). Estos resultados concordam com os fragmentos esperados das análises de restrição.

Dados do mutante IF7:

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene quebrado	Produto do gene quebrado
IF 7	1 385 695	Gene 5904.1 (VII.C/ VII.G) (1386396 - 1384288)	catalase

FIG 25

A

Análise de restrição teórico usando o programa GEN RUNNER. Analisou-se os sítios de clivagem e determinou-se os fragmentos esperados para 2 enzimas nas regiões upstream e downstream do sítio de inserção do transposon no genoma do mutante.

1 2

B Autoradiografia de raios X de transferência southern e hibridização das amostras de DNA do clone IA9 de *Xanthomonas citri*, digeridos com as enzimas *Pst* I (1) e *Ava* I (2), e foram detectados os fragmentos de 1,24 Kb (*Pst* I); 1,18 Kb e 0,6 Kb (*Ava* I). Estes resultados concordam com os fragmentos esperados das análises de restrição.

Dados do mutante IA9:

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene quebrado	Produto do gene quebrado
IA 9	3 100 578	Gene 25785.1 (VIII.B)	Hypothetical protein

FIG 26

A Análise de restrição teórico usando o programa GEN RUNNER. Analisou-se os sítios de clivagem e determinou-se os fragmentos esperados para 2 enzimas, nas regiões upstream e downstream do sítio de inserção do transposon no genoma do mutante.

1 2

B Autoradiografia de raios X de transferência southern e hibridização das amostras de DNAG do clone IC2 de *Xanthomonas citri*, digeridos com as enzimas *Pst I* (1) e *Ava I* (2), e foram detectados os fragmentos de 1,5 Kb (*Pst I*); 1,8 Kb e 1,2 Kb (*Ava I*). Estos resultados concordam com os fragmentos esperados dos analyses de restrição.

Dados do mutante IC2:

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene quebrado	Produto do gene quebrado
IC 2	15 776	Gene 5409.1 (ll.E/)	Cardiolipin synthetase

4.8 Teste de patogenicidade

Todos os mutantes identificados foram testados quanto a sua capacidade de provocar cancro cítrico em citros. Em um processo normal de infecção temos o seguinte quadro: nos sintomas iniciais da doença nas folhas aparecem pequenas lesões similares a bolhas em aproximadamente 7 dias após inoculação. As lesões modificam de cor e aparecem as margens das lesões dilatadas, chamadas encharcamento, rodeado de um halo clorótico amarelo. Com o tempo o centro da lesão torna-se em relevo e semelhante a cortiça, sendo as lesões visíveis em ambos lados das folhas. Finalmente as lesões tornam-se semelhante a um buraco o qual espalha-se, criando o efeito “shot-hole”. Os sintomas da doença são o resultado da dilatação celular (hipertrofia), divisão celular (hiperplasia), e finalmente morte celular (necrose), induzido pela cepa selvagem do patógeno *Xanthomonas citri*.

Como resultado desta avaliação foram detectados mutantes de *Xanthomonas citri* com sua patogenicidade afetada, causado pelo nocaute gênico induzido pelo transposon, obtendo-se nos resultados variações nas características durante o desenvolvimento da doença nas folhas. Assim viu-se um aparecimento muito lento dos sintomas nos primeiros 5 dias após as inoculações dos mutantes **IA9** (Proteína hipotética) e **IC2** (Cardiolipina sintetase), no entanto aos 14 dias de avaliação estes mutantes mostraram continuidade da doença e um ligeiro necrosamento, observado pela coloração no local de infecção. Observamos também mutantes que conseguiram desenvolver os sintomas de necrose com uma maior rapidez que a cepa selvagem. Com esta característica se enquadram os mutantes **IE5** (Proteína hipotética conservada), **IIA10** (Regulador transcripcional), e **IIB6** (Glicina decarboxilase). Outras alterações observadas foram no sintoma de hiperplasia mais desenvolvida ou mais induzida pelo patógeno na planta. Este sintoma aparece antes da necrose, o que indicava que neste caso os mutantes não eram capazes de completar o quadro de sintomas da doença. e os clones que apresentaram estas características foram: **IIA1** [tem afetado seu promotor no gene de avirulência no plasmídeo (pXac 66)], **IIA11** (Ligante de ATP do transportador de açúcar tipo ABC), **IIB8** (Proteína hipotética conservada), **IIC7** (Proteína de montagem da

fimbria), IIC9 (Sistema de dois componentes, proteína sensora). Os registros das avaliações encontram-se a seguir:

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IA9

Clone	Posição de Inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
IA9	3 100 578	Gene 25785.1 (VIII.B/)	Proteína hipotética

Clone IA9 com disrupção no gene 25785.1 (Proteína hipotética). O nocaute da ORF hipotética 25785.1 mostrou no teste de patogenicidade uma diminuição na intensidade dos sintomas da doença nas folhas de cítricos; sendo muito interessante esta ORF por que ela é exclusiva de *Xanthomonas citri*. No genoma ela está localizada ao lado da ORF 25844.1 a qual também é hipotética. Não existem ORFs com função conhecida perto desta ORF hipotética rompida, mas análise por COG mostram que ela tem similaridade com ATPases com função de chaperone ou domínio ligante de ATP.

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IC2

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
IC 2	15 776	Gene 5409.1 (II.E/)	Cardiolipina sintetase

Clone IC2 com disrupção no gene 5409.1 (Cardiolipina sintetase). Este gene da Cardiolipina sintetase, quando rompido em *Xanthomonas* está provocando retardo e diminuição na intensidade nos sintomas de patogenicidade nas folhas dos cítricos. Estudos feitos em outras bactérias (Nishijima et al., 1988) mostram que este lipídeo é um componente de membrana de transdução de energia, sendo que cardiolipina é importante para manter a atividade ótima de um número de proteínas de membrana incluindo NADH dehidrogenase, complexo citocromo bc₁, ATP sintetase, citocromo c oxidase, e várias proteínas de transporte. (Hostetler, 1991). Com as trocas de cardiolipina, há uma mudança na atividade de proteínas maiores na membrana como citocromo c oxidase. Cardiolipina tem função na adsorção de uma variedade de peptídeos solúveis à membrana (Paradies et al., 1993).

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IIB8

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
II B 8	333 919	Gene 7490.1 (VIII.A)	Proteína conservada hipotética

Clone IIB8 com disrupção no gene 7490.1 (Proteína hipotética conservada). Este mutante tem afetado sua patogenicidade mostrando uma intensa e permanente característica de encharcamento (“watersoaking”) na área da infecção, além disso consegue-se observar que não ocorre degradação de tecidos, que mantem a cor verde em comparação aos sintomas desenvolvidos pela cepa selvagem. Este gene é interessante por que é hipotético e ao mesmo tempo conservado uma vez que está presente também em *X. fastidiosa* (ORF XF1829) e *X. campestris*. No genoma está localizado do lado da ORF 7489.1 o qual codifica para uma proteína integral de membrana e ao lado temos a ORF 7487.1 que tem função de ATPase. A ORF 7490.1 de acordo a análises por COG teria similaridade com hidrolases da superfamília alfa/beta.

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IIA11

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
II A 11	2 422 197	Gene 6947.1 (V.A.3/)	Ligante de ATP do transportador ABC de açúcar

Clone IIA11 com disrupção no gene 6947.1 (Ligante de ATP do transportador de açúcar tipo ABC). Neste mutante observamos um aceleração dos sintomas da doença com uma diminuição do sintoma de encharcamento nas bordas e um aumento da clorose sem a degradação de tecidos. O produto deste gene é um transportador ativo encarregado de transportar nutrientes ao citoplasma (Koebnick et al., 2000). Este gene está localizado no genoma do lado da ORF 6944.1 o qual está relacionado ao metabolismo de glicose, e do outro lado encontra-se a ORF 6949.1 que tem um domínio funcional de metiltransferase.

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IIA1

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
II A 1	14515 (pXac 66)	Não (inserido na região promotora do gene 100.2	Proteína de avirulência

Clone IIA1 sem interrupção em um gene. Este clone curiosamente contém o transposon inserido na região promotora do gene 100.2 que encontra-se no plasmídeo pXac66. O efeito desta inserção foi separar mais de 1kb (tamanho do transposon) os promotores da sequência RBS, provavelmente afetando a transcrição do gene. As regiões promotoras foram identificadas pelas sequências GTGTAC e TATGTA achadas em estudos dos genes *avrb6* em *X. Campestris* pathovar *malvacearum* (De feyter et al., 1993) e *avrBs3* em *X. Campestris* pathovar *vesicatoria* (Knoop et al., 1991). Este mutante consegue desenvolver hiperplasia, encontrando-se inibida ou muito retardado o processo de necrose, no entanto a cepa selvagem conseguiu necrosar o local de infecção no mesmo período de tempo.

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IIB6

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
IIB6	1 391 056	Gene 5901.1 (I.A.2/ I.B.10)	Glicina decarboxilase

Clone IIB6 com disrupção no gene 5901.1 (Glicina decarboxilase). Este mutante no teste de patogenicidade apresenta o desenvolvimento de todos os sintomas da doença só que com uma taxa mais rápida do que a cepa selvagem, e sendo mais pronunciado o processo de degradação de tecidos na folha. No genoma a orf rompida está localizada do lado da ORF 25873.1 que codifica para uma carboxilesterase tipo B e do outro lado encontra-se a ORF 5898.1 que codifica para uma proteína de membrana com função de transportador. A enzima glicina decarboxilase está envolvida no metabolismo de glicina para obter serina e CO₂.

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IIC7

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
IIC 7	3 820 996	Gene 2032.1 (IV.D/)	Proteína de montagem da fimbria

Clone IIC7 com disrupção no gene 2032.1 (Proteína de montagem da fimbria). Esta ORF quando rompida no teste de patogenicidade mostrou um leve retardo no desenvolvimento dos sintomas, o mutante consegue induzir cancro na folha e o sintoma de encharcamento aparece mais intenso que o gerado pela cepa selvagem. A fimbria é indicada para atuar na adesão celular de *Pseudomonas syringae* em folhas de feijoeiro, e deficiência deste gene afeta sua virulência (Romantschuk et al., 1993), e contudo em estudos com mutantes de *X. campestris pv vesicatoria* não observou-se redução significativa da virulência em folhas de tomate (Ojanen-rheus et al., 1997).

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IIC9

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
IIC 9	2 537 585	Gene 7276.1 (I.D.1/)	Sistema de dois componentes, proteína sensora

Clone IIC9 com disrupção no gene 7276.1 (Sistema de dois componentes, proteína sensora). Este mutante mostrou um retardo no aparecimento dos sintomas ou seja observamos a formação do cancro, mas não observamos necrosamento do tecido. Além disto observamos que a bactéria espalhou-se levemente menos que a cepa selvagem na área de infecção. Este gene está localizado no genoma do lado da ORF 7274.1 que é um regulador transcripcional e do outro lado encontra-se no mesmo sentido e em operon com a ORF 7277.1 que é um regulador do sistema de dois componentes, o qual estaria também sendo afetado.

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IIA10

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
II A 10	796 654	Gene 5046.1 (I.D.2/)	Regulador transcripcional

Clone IIA10 com disrupção no gene 5046.1 (Regulador transcripcional). O nocaute deste gene mostrou sintomas interessantes, e consegue-se observar que este mutante desenvolveu cancro levemente mais rápido que a cepa selvagem, observando-se nos locais de infecção uma maior área de necrose de tecidos da folha. Este gene está localizado entre duas ORFs de proteínas hipotéticas conservadas 5045.1 e 5047.1, e muito perto da ORF 5045.1 está a ORF 5042.1 com função de protease que poderia estar sendo afetado pela ausência de um suposto regulador.

TESTE DE PATOGENICIDADE : Clone IE5

Clone	Posição de inserção do Transposon	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
IE 5	4 040 666	Gene 2138.1 (VIII.A)	Proteína hipotética conservada

Clone IE5 com disrupção no gene 2138.1 (Proteína hipotética conservada). De forma interessante este mutante mostrou habilidade de induzir cancro e necrosar o local de infecção um pouco mais rápido que a cepa selvagem. É interessante por que esta ORF tem similaridade com a ORF XF0278 de *X. fastidiosa*. E este gene encontra-se localizado no genoma do lado da ORF 2139.1 que tem função de dehidrogenase e do outro lado encontra-se a ORF 2137.1 o qual tem a categoria de proteína hipotética conservada. O gene 2138.1 não apresenta similaridade com algum domínio funcional de acordo com as análises feitas com GOG e PFAM.

Os demais mutantes identificados (tabelas 8 a 11) que foram também testados em plantas não mostraram ter afetado a patogenicidade, produzindo sintomas idênticos ao selvagem.

TABELA: 8 Mutantes randômicos de Xac com patogenicidade não afetada

Clone	Posição de inserção do Transposon no genoma	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
I A 2	1 219 362	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25094.1 e 25716.1
I A 3	2 839 198	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25756.1 e 25191.1
I A 6	861 594	Gene 5125.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
I A 8	3 975 819	Gene 1584.1 Categoria: (V.A.1/)	Proteína simporte de proton-glutamato
I A 12	4 238 225	Gene 3105.1 Categoria: (III.A.4/)	Sistema de reparo do DNA específico para DNA alquilado
I B 1	3 819 866	Gene 25208.1 Categoria: (IV.D/)	Fimbrilina
I B 2	5 064 334	Gene 6688.1 Categoria: (III.A.4/)	Formamidopirimidina DNA glicosilase
I B 10	4 717 660	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 2811.1 e 15127.1
I B 12	5 114 462	Gene 25788.1 Categoria: (I.A.2/)	Uréia amidollase
I C 1	54 410	Gene 25437.1 Categoria: (IV.C/)	Proteína de biosíntese de lipopolissacarídeos
I C 3	539 400	Gene 560.1 Categoria: (V.A.1/)	Transportador de di-tripeptídeo
I D 1	1 183 304	Gene 3369.1 Categoria: (III.D.2/)	Fosfolipase C não-hemolítica
I D 2	4 965 340	Gene 25100.1 Categoria: (II.A.4/)	Shiquimato quinase
I D 3	3 844 759	Gene 25284.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
I E 3	3 012 697	Gene 4236.1 Categoria: (III.A.4/)	Adenina glicosilase A/G-específico
I E 6	2 625 108	Gene 25545.1 Categoria: (VI.B/VII.B)	Proteína relacionada ao plasmídeo
I E 7	570 461	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 11460.1 e 11459.1

TABELA: 9 Mutantes randômicos de Xac com patogenicidade não afetada

Clone	Posição de inserção do Transposon no genoma	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
I E 9	1 086 971	Gene 25313.1 Categoria: (I.B.10/L.C.1)	Piridina nucleotídeo transhidrogenase, subunidade beta
I E 10	3 082 427	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 4335.1.1 e 4337.1
I F 1	3 651 536	Gene 4574.1 Categoria: (III.A.1/)	Helicase dependente de ATP
I F 2	4 386 170	Gene 1445.1 Categoria: (I.C.3/)	Óxidoredutase
I F 3	22 519 (pXac 33)	Gene 46530.1 Categoria: (VI.C/III.A.3)	Transposase Tn5045
I F 5	4 143 842	Gene 2261.1 Categoria: (I.A.1/)	Ramnogalacturonase B
I F 6	1 385 695	Gene 5904.1 Categoria: (VII.C/VII.G)	Catalase
I F 7	1 385 695	Gene 5904.1 Categoria: (VII.C/VII.G)	Catalase
I F 8	2 942 590	Gene 175.1.1 Categoria: (VII.H/III.B.4)	Queuine tRNA-ribosiltransferase
I F 9	4 581 713	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 19502.1 e 1123.1
I F 10	50 245 (pXac 66)	Gene 10163.2 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
I F 12	31 211	Gene 5363.1 Categoria: (VII.D/I.A.1)	Celulase
I G 1	20 149 (pXac 33)	Gene 49540.1 Categoria: (VI.C/)	Transposase
I G 2	4 384 180	Gene 1440.1 Categoria: (I.D.2/)	Regulador transcricional
I G 3	2 911 881	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 973.1 e 972.1
I G 4	25778 (pXac 66)	Gene 10257.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
I G 6	2 673 689	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25523.1 e 25522.1
I G 7	4 454 066	Gene 25266.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
I G 8	3 590 170	Gene 6356.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
I G 9	2 644 976	Gene 25662.1 Categoria: (VI.B/)	Proteína relacionada ao plasmídeo
I G 10	3 971 946	Gene 1579.1 Categoria: (III.C.3/)	Prolina imino-peptidase

TABELA: 10 Mutantes randômicos de Xac com patogenicidade não afetada

Clone	Posição de inserção do Transposon no genoma	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
I G 11	4 415 366	Gene 1492.1 Categoria: (II.A.2/II.B.11/)	UDP-glicose 4-epimerase
I H 1	2 902 074	Gene 15052.1 Categoria: (VIII.C/)	Proteína hipotética conservada de Xanthomonas
I H 3	2 900 815	Gene 812.1 Categoria: (II.A.2/)	Omega-aminoacido-piruvato aminotransferase
I H 5	539 400	Gene 560.1 Categoria: (V.A.1/)	Transportador de di-tripeptídeo
I H 10	1 208 226	Gene 3405.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
I H 12	3 800 540	Gene 46020.2 Categoria: (VI.C/)	Transposase Tn5045
II A 2	4 578 981	Gene 19501.1	RNA Ribossomal
II A 4	71 522	Gene 25010.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
II A 6	233 449	Gene 7646.1 Categoria: (I.C.3/)	Indolpiruvato ferredoxina óxidoredutase, cadeia alfa
II A 8	4 652 613	Gene 7023.1 Categoria: (III.D.3/)	Lipoproteína B1c da membrana externa
II A 9	3 582 759	Espaço Intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25632.1 e 6341.1
II A 12	3 301 433	Gene 1689.1 Categoria: (III.B.5/)	RNA helicase dependente de ATP
II B 1	532 491	Gene 568.1 Categoria: (I.C.6/)	Piruvato desidrogenase E1, subunidade alfa
II B 2	2 015 751	Gene 3467.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
II B 3	5 028 817	Gene 1357.1 Categoria: (I.A.1/VIID)	Xilosidase/arabinosidase
II B 4	1 992 362	Espaço Intergênico	Tn localizado entre as ORFs 3510.1 e 3509.1
II B 9	2 410 664	Gene 6933.1 Categoria: (V.A.7/)	Proteína de transporte
II B 10	4 326 019	Gene 25125.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
II B 11	3 645 748	Gene 4581.1 Categoria: (IV.D/V.C)	Proteína do pilus
II B 12	4 242 735	Gene 3110.1 Categoria: (IV.A.1)	Proteína IpsJ
II C 1	4 459 379	Gene 2944.1 Categoria: (IV.C/)	Lauril aciltransferase para biosíntese do lipídeo A

TABELA: 11 Mutantes randômicos de Xac com patogenicidade não afetada

Clone	Posição de inserção do Transposon no genoma	Gene interrompido	Produto do gene interrompido
II C 2	5 053 981	Gene 6699.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
II C 3	2 883 395	Gene 783.1 Categoria: (VII.C/V.A.7)	Proteína de transporte
II C 4	163 132	Gene 3664.1 Categoria: (I.D.2/IX)	Regulador transcricional
II C 5	2 537 585	Gene 7276.1 Categoria: (I.D.1/)	Sistema de dois componentes, proteína sensora
II C 6	3 645 748	Gene 4581.1 Categoria: (IV.D/V.C)	Proteína do pilus
II C 8	5 959 041	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25101.1 e 606.1
II C 10	2 802 797	Gene 1900.1 Categoria: (III.A.4/)	Proteína MutL para reparo de DNA "mismatch"
II C 11	3 645 748	Gene 4581.1 Categoria: (IV.D/V.C)	Proteína do pilus
II C 12	1 250 008	Gene 394.1 Categoria: (II.D.4/)	Proteína A para biosíntese do cofator molibdênio
II D 1	4 471 861	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 2926.1 e 2923.1
II D 2	19 355 (pXac 33)	Gene 49520.1 Categoria: (VI.C/III.A.3)	Transposase
II D 3	1 668 224	Gene 4834.1 Categoria: (VII.C/V.A.7)	Bomba de fluxo para resistência a drogas
II D 5	50 260 (pXac 66)	Gene 10163.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
II D 6	3 800 363	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 25806.1 e 46020.1
II D 7	214 169	Gene 7670.1 Categoria: (II.D.4/)	Fenilalanina hidroxilase
II D 8	49 591 (pXac 66)	Gene 162.2 Categoria: (VI.B/III.A.1)	Proteína de replicação A
II D 9	64 865 (pXac 66)	Gene 10322.1 Categoria: (VIII.B/)	Proteína hipotética
II D 10	3 979 556	Gene 1589.1 Categoria: (VIII.A/)	Proteína hipotética conservada
II D 11	863 777	Gene 5131.1 Categoria: (I.C.3/)	Citocromo C4
II D 12	4 354 921	Espaço intergênico	Tn localizado entre as ORFs 973.1 e 972.1
XI H 12	2 179 435	Gene 2372.1 Categoria: (VII.H/I.D.1)	Proteína RpfC

É interessante observar que o mutante **XIH12** com disrupção no extremo 5' do gene *RpfC* em *X. axonopodis pv citri* não mostrou diminuição na sua virulência, nos testes de patogenicidade, sendo que estes resultados são contraditórios aos resultados de mutação do mesmo gene em outras bactérias do gênero *Xanthomonas*. Estudos em *X. campestris pv campestris* e *X. oryzae pv oryzae*, sugerem que a produção de EPS (“extracellular polysaccharide”) é controlada pelo gene *rpfC*, o qual é parte de um sistema de transdução de sinal de dois componentes, sendo que uma mutação no gene *rpfC*, afetou grandemente a produção de EPS nas bactérias e sua virulência (Tang et al., 1991; 1996).

5. DISCUSSÃO

O estudo de mutantes de bactérias tem contribuído grandemente ao entendimento de vias do metabolismo primário bacteriano. Assim o sistema de mutagenese por transposição oferece um eficiente meio para gerar bibliotecas de mutantes com genes rompidos (Berg et al., 1989; Kleckner et al., 1991)

Usando o sistema de transposição, foram geradas bibliotecas de mutantes randômicos de *Xanthomonas axonopodis pv. citri*, onde foram selecionadas as bactérias mutantes no meio seletivo KLB agar/ Canamicina (50 µg/ml), com uma eficiência de transformação de 1×10^5 , por µg de DNA, onde a eletroporação foi efetiva para conseguir esta eficiência. Assim outros trabalhos mostram resultados de tentativas de geração de mutantes, sendo que na bactéria fitopatogênica *Xylella fastidiosa*, usou-se vetores suicidas sozinhos (pBSL181, p2021) e outros com um transposon inserido (pSUP102Cm::Tn5) sem sucesso. Usando o sistema transposome conseguiram obter mutantes (Guilhabert et al., 2001)

A primeira característica dos mutantes que foi observada nos meios de crescimento foi uma leve variação na intensidade da coloração amarela que é característica na espécie devido a um pigmento chamado Xanthomonadina. Este

pigmento amarelo está ligado à membrana celular (Dianese and Schaad, 1982) e acredita-se que Xanthomonadina tem a função de proteção contra danos fotobiológicos (Jenkins and Starr, 1982b) em outros casos foi observado nos meios de crescimento sólido o crescimento lento de alguns mutantes em relação a outros mutantes .

Para o mapeamento dos mutantes, nós desenvolvemos uma nova metodologia baseada em oligonucleotídeos semidegenerados e uma variante da PCR chamada PCR touchdown (Don et al., 1991). Um dos motivos pela qual utilizou-se esta metodologia foi por que fazer o seqüenciamento da região genômica onde foi inserido o transposon a partir de uma amostra de DNA genômico não seria muito produtivo. A PCR touchdown foi necessario por que neste método gera-se amplificadas a diferentes temperaturas de anelamento, sendo assim na condição inicial de 60 °C diminuindo até 45 °C a combinação entre um oligonucleotídeo altamente específico para a região que se deseja mapear e um oligonucleotídeo semidegenerado favorece a reação específica. Em uma segunda rodada usou-se uma temperatura de anelamento fixa de 50 °C para selecionar os fragmentos mais específicos, conseguindo-se amplificadas fortes e alguns amplificadas fracos não específicos. Assim Hecker e Roux, 1996, demonstraram também que o PCR touchdown otimizava a produção de amplificadas, usando oligonucleotídeos semidegenerados, e compararam os amplificadas obtidos por PCR convencional a diferentes temperaturas de anelamento, observando que os produtos específicos diminuem em maiores temperaturas de anelamento (60-65 °C) e da mesma forma nas baixas temperaturas de anelamento o amplificado específico fica fraco até não conseguir amplificar em temperaturas muito baixas (40 °C) e usando uma ciclagem com as temperaturas de anelamento de 60 a 45 °C diminuindo em 1 °C em cada ciclo seguido de outra ciclagem com 50 °C no anelamento, conseguiram obter os amplificadas esperados.

Os oligonucleotídeos específicos (KAN-2 RP-1/ KAN-2 FP-1) em combinação com cada um dos oligonucleotídeos semidegenerados (HIB17/ APYBAF1) geraram resultados similares em amplificações nas mesmas condições de ciclagem, no entanto os oligonucleotídeos KAN-2 FP-1 + HIB17 mostraram melhores resultados na condição do PCR otimizado. Os oligonucleotídeos semidegenerados usados nesta pesquisa foram

desenhados de acordo aos princípios indicados por Rose et al., 1998. e usados inicialmente com o intuito de gerar uma biblioteca de cDNAs de *Schistosoma mansoni* (Fietto et al., 2002). Assim estes oligonucleotídeos semidegenerados foram utilizados junto a um oligonucleotídeo específico com a nova finalidade de mapear mutantes randômicos de *Xanthomonas citri*, obtendo-se sucesso.

Existem outras estratégias de mapeamento de mutantes mas são limitadas devido a que estas procuram achar mutantes em genes essenciais, mas não tendo uma técnica padronizada que avalie todos os mutantes gerados com as mesmas condições. Assim a metodologia “Genetic Footprinting”, desenvolvida inicialmente para leveduras, determina a função de genes seqüenciados em organismos, mapeam-se genes usando o PCR e dois oligonucleotídeos específicos: um oligonucleotídeo para um extremo do gene sob pesquisa e outro oligonucleotídeo para um extremo do transposon, fazendo uma varredura gene por gene, para obter informação sobre a função do gene nocauteado do organismo sob condições de crescimento em meio enriquecido e em meio pobre.(Smith et al., 1995). Na metodologia GAMBIT (“genomics analysis and mapping by in vitro transposition”) usa transposição *in vitro*, transformação e “Genetic footprinting” mas esta metodologia está limitada a achar genes que são essenciais para a sobrevivência da bactéria.(Akerley et al., 1998).

Por outro lado com esta nova metodologia desenvolvida pode-se passar uma barreira para conseguir mapear e identificar mutantes randômicos, o qual não fica so limitado aos genes essenciais. Na geração de mutantes usando transposon observou-se uma pequena porcentagem de repetição dos mesmos sítios de inserção, indicando possíveis “hot spots” nos mutantes identificados, mas também não se descarta a possibilidade de ter acontecido uma duplicação dos clones mutantes antes do espalhamento nas placas de cultura. Assim observou-se que alguns clones tinham uma interrupção gênica na posição 3 645 748; outros clones tinham a interrupção gênica na posição 539 400 e na posição 1 385 695. Estas redundâncias do sítio de inserção do transposon representam o 4,4% do total de mutantes identificados. Assim diferentes explicações para a existência de “hot spots” foram propostos, sendo que em transposons

Tn9 as regiões de preferível integração foram determinadas por ser regiões ricas em seqüências A-T (Meyer et al., 1980; Zerbib et al., 1985). Uma alta freqüência de inserção do Tn9 foi detectada em regiões promotoras dos genes.

No transposon Tn5, um modelo proposto sugere que uma parcial homologia entre os sítios de inserção no DNA alvo e seqüências terminais do Tn5 é importante (Lupski, et al. 1984), sendo outra proposta que o Tn5 tem preferência na integração nos sítios de ativa transcrição ou regiões no DNA com muito “supercoiled”, o qual não estaria relacionado à especificidade da seqüência, mas sim a preferências na topologia do DNA alvo. (McKinnon et al., 1985; Lodge and Berg, 1990).

Com o sistema de mutagênese randômica conseguiu-se mapear 90 mutantes randômicos dos quais 16,7 % destes clones tinham a inserção do transposon no espaço intergênico, mas o restante 83,3 % dos mutantes tinham disrupção gênica, o qual foi um resultado bom para fazer estudos funcionais destes mutantes. O maior incentivo para desenvolver um rápido procedimento por amplificação PCR, foi que seja capaz de seqüenciar rapidamente um grande número de mutações cromossômicas no patógeno.

Os estudos funcionais de mutantes produzem informações que ajudam a descobrir funções desconhecidas ou a relação de determinados genes que podem afetar o crescimento, patogenicidade entre outras características. Assim usando estes testes demonstrou-se que o nocaute num gene *gumG* em *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* causa a perda da produção do polissacarídeo extracelular e de sua virulência (Dharmapuri and Sonti, 1999). Da mesma forma estudos funcionais de genes nocauteados com testes de patogenicidade mostrou interessantes resultados em *Xanthomonas citri* com as variações no desenvolvimento dos sintomas dos mutantes testados e em alguns casos detectou-se que o nocaute em genes com funções hipotéticas ocasionou alteração na patogenicidade da bactéria

Nos testes de patogenicidade observou-se que 10 mutantes apresentaram alteração dos sintomas da doença. Comparando com a cepa selvagem viu-se mutantes que induziam um aparecimento muito lento dos sintomas nos primeiros 5 dias após as

inoculações nos mutantes, no entanto aos 14 dias de avaliação estes mutantes mostraram continuidade da doença e necrosamento muito devagar observado pela coloração no local de infecção. No caso do mutante **IA9** (Proteína hipotética) identificou-se que tem disrupção numa ORF hipotética com análise funcional GOG com similaridade a ATPase, o que sugere que poderia estar afetada esta função, o qual explicaria a fraqueza dos sintomas. O mutante **IC2** (cardiolipina sintetase) com nocaute no gene de cardiolipina sintetase, mostra que é um gene funcional e que esta sendo afetado a síntese do lipideo cardiolipina, o qual é um componente de membrana. Sendo que cardiolipina é importante para manter a atividade ótima de um número de proteínas de membrana e várias proteínas de transporte (Hostetler, 1991) o que indicaria que está sendo afetado de forma leve o fluxo de enzimas degradativas como celulases entre outras. Estudos de disrupção no gene *cls* (cardiolipin sintetase) em *E. coli*, mostrou que a mutação neste gene afeta a síntese de cardiolipina e a taxa de crescimento obtendo densidades de cultura muito mais baixas do que a cepa selvagem (Nishijima et al., 1988).

Alguns dos mutantes conseguiram desenvolver os sintomas da doença com uma maior rapidez que a cepa selvagem, observados pelas características de necrose, e os mutantes que apresentaram estas alterações foram os mutantes **IE5** (Proteína conservada hipotética), **IIA10** (Regulador transcricional), o análise pfam deste gene rompido indicaria que tem similaridade com um regulador transcricional bacteriano tipo “helix-turn-helix” e observou-se que o gene rompido encontra-se perto de um gene com função protease, o qual poderia estar afetando. **IIB6** (Glicina decarboxilase), o análise pfam deste gene rompido indica que tem similaridade com a proteína P do sistema de clivagem da glicina, assim esta proteína estaria encarregada da decarboxilação oxidativa da glicina. (Bourguignon et al., 1988) sendo interessante que nestes clones ao contrario de observar-se deficiências nos sintomas induzidos pelo nocaute se observou um incremento na patogenicidade, precisando-se ainda de outros estudos que ajudem a explicar o aumento da virulência destes mutantes.

Em outros testes observaram-se hiperplasia mais desenvolvida ou mais induzida pelo patógeno na planta e sendo uma característica destes mutantes que não conseguem

necrosar o tecido das folhas quando a cepa selvagem já conseguiu necrosar no mesmo período de avaliação. O mutante **IIA1** tem afetado seu promotor no gene de avirulência no plasmídeo pXac 66, o que ocasiona um distanciamento maior dos promotores com a região RBS do gene, possivelmente suprimindo a transcrição e tradução deste gene de avirulência. Assim mesmo no patógeno Xac existem outras três cópias deste gene de avirulência nos plasmídeos (Da Silva et al., 2002). Estudos de patogenicidade mostraram que cepas de *X. campestris pv. vesicatoria* contendo um gene *avrBs2* inativado foram menos agressivas que a cepas selvagem em culturas susceptíveis de pimenta (Minsavage et al., 1990). Assim mesmo mutantes com genes homólogos ao gene *avrBs2* em *X. campestris pv. alfalfae* tinham afetada a sua capacidade de crescimento em plantas de alfalfa (Kearney and Staskawicz, 1990). O mutante **IIA11** (Ligante de ATP do transportador de açúcar tipo ABC), teria afetada a sua capacidade de transporte ativo dos açúcares do meio extracelular que precisa para seu crescimento, formação de LPS e goma, diminuindo sua patogenicidade. Sabe-se que os transportadores ABC (“ATP-binding cassette”) de membrana interna acopla a hidrólise do ATP com o transporte ativo de nutrientes ao citoplasma (Davidson, 2002). Assim um mutante de *Spiroplasma citri* obtido por transposição, tinha uma deficiência para usar frutose, mostrando ser menos patogênico que a cepa selvagem (Gaurivaud et al., 2000), mostrando que uma deficiência no transporte de açúcares afeta a patogenicidade da bactéria. O mutante **IIB8** (Proteína hipotética conservada), é interessante também pelo fato de ter esta mesma ORF em *Xylella fastidiosa*, tendo esta ORF uma possível função de hidrolase. O mutante **IIC7** (Proteína de montagem da fimbria), tem o nocaute no gene *pilC*, o qual forma parte do operon para a formação da fimbria, observando-se alteração nos sintomas. Além disso, estudos em *X. campestris pv. vesicatoria*, mostram que a fimbria está envolvida em processos de agregação celular, e um mutante do gene *fimA* tinha reduzida sua virulência levemente em folhas de tomate (Ojanen-Rhesus et al., 1997). O gene nocauteado do mutante **IIC9** (Sistema de dois componentes, proteína sensora), também afetou a sua patogenicidade. Saiba-se que o produto deste gene quando funcional ajuda à bactéria a reagir frente a um estímulo do meio ambiente. A importância deste sistema de dois componentes no controle de metabolismo e regulação de fatores de virulência já foi demonstrada em várias espécies bacterianas (Dziejman and Mekalanos, 1995). Estudos

funcionais de mutantes da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, que infeta as raízes da planta de batata, tinha nocauteado o gene *colS* o qual forma parte do sistema de dois componentes ColR/ColS, e como consequência da mutação a bactéria tinha um baixo nível de infecção (colonização) nos tecidos testados.(Dekkers et al., 1997)

No caso das ORFs hipotéticas que contêm inserção do transposon e que não mostraram alteração na sua patogenicidade, pode-se pensar que verdadeiramente estas ORFs não estariam relacionadas com a patogenicidade da bactéria e estariam envolvidas em outros processos metabólicos da bactéria.

São de importância neste estudo também aquelas ORFs de proteínas conservadas hipotéticas devido a que ao achar uma alteração na patogenicidade da bactéria por causa do nocaute num destes genes em *Xanthomonas citri*, se determinaria a mesma característica funcional em outra bactéria fitopatogena como *Xylella fastidiosa*, a qual tem também estas ORFs.

Em resumo, nós geramos mutantes randômicos de *Xanthomonas citri* dos quais conseguimos identificar 90 clones usando a nova metodologia desenvolvida para o mapeamento destes mutantes, usando o PCR touchdown com oligonucleotídeos semidegenerado e específico, sendo agora esta metodologia uma importante ferramenta na procura de genes nocauteados gerados por transposição.

6. BIBLIOGRAFIA

- Achor, D.S., Browning, H.W., and Albrigo, L.G.** (1996). Anatomical and histological modification in citrus leaves caused by larval feeding of citrus leaf-miner (*Phyllocnistis citrella* Station). Page 69 in: Proc. Int. Conf. Citrus Leafminer, Orlando, florida, April 23-25, University of Florida, Gainesville.
- Agrianual.** Custo de produção – laranja. *FNP Consultoria & Comércio*, Ed. Argos, p.289, 2001.
- Akerley, B.J., Rubin, E.J., Camilli, A., Lampe, D.J., Robertson, H.M., and Mekalanos, J.J.** (1998). Systematic identification of essential genes by *in vitro* mariner mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 8927-8932.
- Alfano, J.R. and Collmer, A.** (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: Trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.* 179: 5655-5662.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Alvarez, A.M., Benedict, A.A., Mizumoto, C.Y., Pollard, L.W., and Civerolo, E.L.** (1991). Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. c. Citrumelo* with monoclonal antibodies. *Phytopatology*, 81: 857-865.
- Anthony, R.M., Brown, T.J., french, G.L.** (2000). Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.*, 38(2): 781-788.
- Berg, D.E., and Berg, C.M.** (1983). The prokaryotic transposable element Tn5. *Biotechnology*, 1: 417-435.

- Berg, C.M., Berg, D.E., and Groisman, E.A.** (1989) Transposable elements and the genetic engineering of bacteria, p 879-925. In D.E. Berg and M.M. Howe (ed.), Mobile DNA. *American society for Microbiology*, Washington, D.C.
- Bitancourt, A.A.** O cancro cítrico. *O biológico*. São Paulo, p. 101-123. 1957.
- Bonas, U., Stall, R.E., Staskawicz, B.**(1989). Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.*, 218:127-136.
- Borguignon, J., Neuburger, M., Douce, R.,** (1988). Resolution and characterization of the glycine-cleavage reaction in pea leaf mitochondria. Properties of the forward reaction catalysed by glycine decarboxylase and serinehydroxymethyltransferase. *Biochem. J.* 255(1): 169-178.
- Brujin, F.J., and Lupski, J.R.** (1984). The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetical maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids – A review. *Gene*, 27: 131-149.
- Chen, J., Roberts, P.D., and Gabriel, D.W.** (1994). *Phytopathology*, 84: 1485-1465.
- Civerolo, F.L.** (1984). Bacterial canker disease of citrus. *J. Rio grande Valley Hort Assoc.* 37: 127-146.
- Cook, A.A.** (1988). Association of citrus canker pustules with leafminer tunnels in North Yemen. *Plant. Dis.*, 72: 546.
- Cubero, J., Graham, J.H.** (2002). Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new oligonucleotides for their identification by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1257-1264.

- Cubero, J., and Graham, J.H., and Gottwald, T.R.** (2001). Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2849-2852.
- Da Silva, A.C.R et al.** (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417 :459-463
- Daniels, M.J., Barber, C.E, Turner, P.C., Cleary, W.G., Sawczyc, M.K.** (1984). Isolation of mutants of *Xanthomonas campestris pv campestris* showing altered pathogenicity. *J. Gen. Microbiol.*, 130; 2447-2455.
- Davidson, A.M.** (2002). Not just another ABC transporter. *Science*, 296: 1038-1040
- De Feyter , R., and D.W. Gabriel.** (1991). Use of cloned DNA methylase genes to increase the frequency of transfer of foreign genes into *Xanthomonas campestris pv malvacearum*. *J. Bacteriol.*, 173: 6421-6427.
- De Feyter, R., Yang, Y. and Gabriel D..** (1993). Gene-for-genes interactions between cotton *R* genes and *Xanthomonas campestris pv malvacearum avr* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6:225-237.
- Dekkers, L.C., Bloemendaal, C.J.P., De Weger, L.A., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P., and Lugtenberg, B.J.J.** (1998). A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, vol. 11, 1: 45-56.
- Dharmapuri, S. and Sonti, R.V.** (1999). A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*, 179: 53-59.

- Dianese, J.C., and Schaad, N.W.** (1982). Isolation and characterization of inner and outer membranes of *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Phytopathology*, 72: 1284-1289.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., and Dveksler, G.S.** (1993). General concepts for primer design. *PCR Methods Appl.*, 3: S30-S37.
- Don, R.H., et al.** (1991). Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, 19: 4008.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Rgsdale, C.W.** (1988). *Nucleic Acids Res.*, 16:6127.
- Duan, Y.P., Castañeda, A., Zhao, G., Erdos, G., and Gabriel, D.W.** (1999). Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement, and cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, Vol 12, 6:556-560.
- Dziejman, M., and Mekalanos, J.J.** (1995). Two-component signal transduction and its role in expression of bacterial virulence factors, pp. 305-17. In J.A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.), Two component signal transduction. *American Society for Microbiology*, Washington D.C.
- Egel, D.S., Graham, J.H., and Stall, R.E.** (1991). Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2724-2730.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132: 6-13.

- Fietto, J.L.R., De Marco, R. and Verjovsky-almeida, S.** (2002). Use of degenerate oligonucleotides and PCR touchdown for construction of cDNA libraries. *Biotechniques*, 32 (5).
- Fundecitrus.**(2000). Cancro cítrico da sinais de melhora. *Revista do Fundecitrus*, n. 98, p. 10-11.
- Gabriel, D.W., Burgues, A., and Lazo, G.R.** (1986). Gen-for-gene recognition of five avirulence genes from *Xanthomonas campestris pv malvacearum* by specific resistance genes in cotton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 6415-6419.
- Gaurivaud, P., Laigret, F., Verdin, E., Garnier, M., and Bové, J.M.** (2000). Fructose operon mutants of *Spiroplasma citri*. *Microbiology* 146: 2229-2236.
- Gopalan, S., Bauer, D.W., Alfano, J.R., Loniello, A.O., He, S.Y., and Collmer, A.** (1996). Expression of the *Pseudomonas syringae* avirulence protein AvrB in plant cells alleviates its dependence on the hypersensitive response and pathogenicity (Hrp) secretion system in eliciting genotype-specific hypersensitive cell death. *Plant Cell* 8: 1095-1105.
- Goryshin, I Y. And Reznikoff, W. S.** (1998). Tn 5 *in vitro* transposition. *J. Biol. Chem.*, 273: 7367- 7374.
- Goryshin, I. Y., Jendrisak, J. J., Hoffman, L. M., Meis, R. M., and Reznikoff, W. S.** (2000). Insertional transposon mutagenesis by eletroporation of released Tn5 transposition complexes. *Nat. Biotechnol.*, 18: 97-100
- Goryshin, I.Y., Miller, J.A., Kil, Y.V., Lanzov, V.A., and Reznikoff, W.S.** (1998). Tn5/IS50 target recognition. *Genetics*, 18: 10716-10721.

- Goto, M.** (1992). Citrus canker. Pages 250-269 in: Plant Diseases of International Importance. J. Kumar, H.S. Chaube, U.S. Singh, and A.N. Mukthopadhyay, cds. Prentice-Hall, Englewood Cliff, NJ.
- Goto, M.**(1962). Studies on citrus canker. *I. Bull. Fac. Agri. Shizuoka University* 12: 3-72.
- Goto, M., and Yagushi, Y.** (1979). Relationship between defoliation and disease severity in citrus canker (*Xanthomonas citri*). *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.*, 45: 689-694.
- Gottwald, T.R., and Graham, J.H.** (1992). A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. *Phytopathology*, 82: 930-935.
- Gottwald, T.R., McGuire, R.G., and Garran, S.** (1988). Asiatic citrus canker; spatial and temporal spread in simulated new planting situations in argentina. *Phytopathology*, 78: 739-745.
- Gottwald, T.R., Timmer, L.W., and McGuire, R.G.**(1989). Analysis of disease progress of citrus canker in nurseries in Argentina. *Phytopathology*, 79: 1276-1283.
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Browning, H.S., and Achor, D.S.** (1996). Citrus leafminer exacerbated the outbreak of Asiatic citrus canker in South Florida. Page 83 in: Proc. Int. Conf. Citrus Leafminer, held in Orlando, Florida, April 23-25, University of Florida, Gainesville.
- Graham, J.H., Gottwald, T.R., Riley, T.D., and Achor, D.** (1992). Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. *Phytopathology*, 82: 1319-1325.

- Greenberg, J.T.** (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 48:525-545.
- Guilhabert, M.R., Hoffman, L.M., Mills, D.A., and Kirkpatrick, B.C.**(2001). Transposon mutagenesis of *Xylella fastidiosa* by electroporation of Tn5 synaptic complexes. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 14(6): 701-706.
- Hartung, J.S., Daniel, J.F., and Pruvost, O.P.**(1993). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:1143-1148.
- Hartung, J.S., and Civerolo, E.L.** (1989). Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Pages 503-508 in proc. 7th Int. Conf. Plant. Path. Bacteria, Akademiai kiado, Budapest, Hungary.
- Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Villemot, I., and Alvarez, A.** (1996). Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and nested-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86: 95-101.
- Hartung, J.S.,** (1992). Plasmid-based hybridization probes for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Plant. Dis.*, 76:889-893.
- Hauben, L., vauterin, L., Swings, J., Moore, E.R.B.,** (1997) Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Internat. J. Syst. Bacteriol.* 47: 328-335.
- He, S.Y.** (1998). Type III protein secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 36:363-392.

- Hecker, K.H., and Roux, K.H.** (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*, 20: 478-485.
- Hensel, M., Shea, J.E., Gleeson C., Jones, M.D., Dalton, E., Holden, D.W.** (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, 269: 400-403.
- Heppner, J.P.** (1993). Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, in Florida. *Tropical Lepidoptera* 4: 49-64.
- Herbers, K., Conrads-strutch, J., and Bonas, U.** (1992). *Nature*, 356: 172-174.
- Hostetler, K. Y.** (1991). *Biochim. Biophys. Acta* . 1086: 139-140
- Jenkins, C.L., and Starr, M.P.** (1982b). The brominated aryl-polyene (xanthomonadin) pigments of *Xanthomonas juglandis* protect against photobiological damage. *Current Microbiology*, 7: 323-326.
- Kearney, B., and Staskawics, B.J.** (1990). Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature* 346:385-386.
- Kleckner, N., Bender, J., and Gottesman, S.** (1991) Use of transposons with emphasis on Tn10. *Methods. Enzymol.* 204: 139-180.
- Knapp, J.L., Albrigo, L.G., Browing, H.W., Bullock, R.C., Heppner, J.B., Hall, D.G., Hoy, M.A., Nguyen, R., Peña, J.E., Stansly, P.A.** (1995). Citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella* Station: Current Status in Flórida. Gainesville: Flórida Cooperative Extensive Service, 35p.

- Knoop, V., Staskawicz, B. and Bonas, U..** (1991). Expression of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* is not under the control of *hrp* genes and is independent of plant factors. *J. Bacteriol.*, 173: 7142-7150
- Koebnick, R., Locher, K.P., van Helder, P.**(2000). *Mol. Microbiol.*, 37: 239.
- Koizumi, M.** (1985). Citrus canker: The world situation. Pp2-7: Citrus canker: An international perspective. L.W. Timmer, ed. Citrus Research & Education center, University of Florida, Lake alfred.
- Leach, J.E., and White, F.F.** (1996). Bacterial avirulence genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:153-179.
- Leyns, F., De Cleene, M., Swings, J.G. & De Ley, J.** (1984). The host range of the genus *Xanthomonas*. *The Botan. Rev.*, 50: 308 – 356.
- Lodge, J.K., and Berg, D.E.** (1990). *J. Bacteriol.* , 172: 5956-5960.
- Loucks, K.W.** (1934). Citrus canker and its eradication in Florida. Unpublished manuscript in the archives of the Florida Departament of Agriculture, Division of Plant Industry, Gainesville.
- Lupski, J.R., Gershon, P., Ozaki, L.S. and Godson, G.N.** (1984). *Gene*, 30:99-106
- McKinnon, R.D., Waye, J.S., Bautista, D.S., and Graham, F.L.** (1985). *Gene*, 4031-38.
- McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.H., and Staskawicz, B.J.** (1998). Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *Plant J.* 14:247-257.

- Marques, A.S.A., Robbs, C.F., Boiteux, L.S. and parente, P.M.G.** (1994) Índice de fitobacteriosis assinaladas no Brasil. Empresa brasileira de pesquisa agropecuária, Centro de pesquisa de recursos genéticos e biotecnologia. Brasília; *EMBRAPA-SPI*, 65 p.
- Metcalf, W.W., Jiang, W., Daniels, L.L., Kim, S.-K., Haldimann, A., and Wanner, B.L.** (1996). *Plasmid*, 35: 1-13.
- Meyer, J.F., Lida, S., and Arber, W.** (1980). *Mol. Gen. Genet.* 178: 471-473.
- Minsavage, G.V., Dahlbeck, D., Whalen, M.C., Kearney, B., Bonas, U.** (1990). Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 3:41-47.
- Nascimento, A.S., & Vidal, C.A.**(1988). Ocorrência de parasitóides e local de preferência para desenvolvimento da larva minadora das folhas dos citros *Phyllocnistis citrella* Station, 1856, em Cruz das Almas, BA. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 17., Rio de Janeiro, RJ. Resumos. P.373.
- Neves, E.M. and Boteon, M.** Impactos alocativos e distributivos na citricultura. *Preços Agríc., Piracicaba*, n. 132, p.3-6, 1998.
- Ojanen-Reuhs, T., Kalkkinen, N., Westerlund-Wikström, B., van Doorn, J., Haahetla, K., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Wengelnik, K., Bonas, U., Korhonen, T.M.** (1997). Characterization of the *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *J. Bacteriol.*, 179(4): 1280-1290.
- Paradies, G., Rgggiero, F. M., Dinoi, P., Petrosillo, G, & Quagliariello, E.** (1993) *Arch Biochem Biophys.*, 397: 91-95

- Pósfai, G., Kolisnychenko, V., Bereczki, Z., and Blattner, F.R.** (1999). *Nucleic Acids Res.*, 27: 4409-4415.
- Pruvost, O., Hartung, J.S., Civerolo, E.L., Dubois, C., and Perrier, X.,** (1992). Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Phytopathology*, 82: 485-490.
- Rychlik, W. and Rhoads, R.E.** (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 17: 8543-8551.
- Rodrigues, J.C.V., Rossetti, V., Machado, M.A., Sobrinho, J.T., de Lima-Nogueira, N.** (1998). Citrus leafminer: A factor for increase of pests and citrus canker. *Laranja*, 19: 49-60.
- Romantschuk, M., and Bamford, D.** (1986). The causal agent of halo blight in bean, *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*, attaches to stomata via its pili. *Microb. Pathog.* 1: 139-148.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum C.M. and Steven Henikoff.** (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotides for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research*, 26(7):1628-1635.
- Rudolph, K., Roy, M.A., Sasser, M., Stead, D.E., Davis, M., Swings, J., and Gossele, F.** (1990). Isolation of bacteria. Pp 45-49 in: *Methods in Phytobacteriology*. Z. Klement, K. Rudolph and D.C. Sands, eds. Akademiai Kiado, Budapest.
- Russell, C.B., Thaler, D.S., and Dahlquist, F.W.** (1989). *J. Bacteriol.*, 171: 2609-2613.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.E.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanger, F., Niklen, S., Coulson, A.R.** (1977b). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- Satomi, N., Asami, Y., Uetake, N., Yamagoe, S., Ohta A. and Isao Shibuya.** (1988). Disruption of the *Escherichia coli* *cls* gene responsible for cardiolipin synthesis. *J. Bacteriol.*, 170(2): 775-780.
- Schuber, T.S., Rizvi, S.A., Sun, X., Gottwald, T.R., Graham, J.H. and Dixon, W.N.** (2001). Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-Again. *Plant. Dis.* 85:340-356.
- Simpson, A.J. et al.** (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406: 151-157.
- Sinha, M.K., Batra, R.C., and Upal, D.K.** (1972). Role of citrus leaf-miner *Phyllocnistis citrella* Stainton (sic) on the prevalence and severity of citrus canker [*Xanthomonas citri* (Hassé) Dowson]. *Madras Agr. J.*, 59: 240-245.
- Smith, V., Botstein, D., Brown, P.O.** (1995). Genetic footprinting: a genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6479-6483.
- Smith, V., Chou, K.N., Lashkari, D., Botstein, D., Brown, P.O.** (1996). Functional analysis of the genes of yeast chromosome V by genetic footprinting. *Science*, 274: 2069-2074.

- Sohi, G.S., and Sandhu, M.S.** (1968). Relationship between citrus leafminer (*Phyllocnistis citrella* Stainton) injury and citrus canker [*Xanthomonas citri* (Hasse) Dowson] incidence on citrus leaves. *J. Res. Punjab Agric. University (Ludhiana)* 5: 66-69.
- Stall, R.E., Miller, J.W., Marco, G.M., and Canteros de Echenique, B.I.** (1980). Population dynamics of *Xanthomonas citri* causing canker of citrus in Argentina. *Proc. Fla. Hort. Soc.*, 93: 10-14.
- Swarup, S., De Feyter, R., Bransky, R.H. and Gabriel, D.W.** (1991). *Phytopathology*. 81: 802 – 809.
- Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M.T., and Gabriel, D.W.** (1992). *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5: 204-213.
- Swings J.G. and Civerolo, E.L.** (1993). *Xanthomonas* (eds. J.G. Swings and E.L. Civerolo), The Chapman & Hall, London
- Tang, J.L., Feng, J.Z., Li, Q.Q., Wen, H.X., Zhou, D.L., Wilson, T.J.G., Dow, J.M., Ma, Q.S., Daniels, M.J.** (1996). Cloning and characterization of the *rpfCi* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: involvement in exopolysaccharide production and virulence to rice. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:664-666.
- Tang, J.L., Lui, Y-N., Barber, C.E., Dow, J.M., Wootton, J.C., Daniels, M.J.** (1991). Genetic and molecular analysis of a cluster *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol. Gen. Genet.*, 226:409-417.
- Timmer, L.W., Zitko, S.E., and Gottwald, T.R.** (1996). Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv *citri* on symptomatic and asymptomatic citrus leaves under various environmental conditions. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 1: 448-451.

- Vernière, C., Hartung, J.S., Pruvost, O.P., Civerolo, E.L., Alvarez, A.M, Maestri, P., and Luisetti, J.** (1998). Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from southwest Asia. *Europ. J. Plant. Pathol.*, 104:477-487.
- Voelker, L.L., and Dybvig, K.** (1998). Transposon mutagenesis. *Methods Mol. Biol.*, 104:235-238.
- Yang, Y., De Feyter, R., and Gabriel, D.W.** (1994). *Mol. Plant-Microbe interact.*, 7: 345-355.
- Yang, Y., and Gabriel, D.W.** (1995). *Xanthomonas* avirulence/ pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals. *Mol. Plant-Microbe interact.* 8: 627-631
- Yang, Y., Yuan, O., Gabriel, D.W.** (1996). Watersoaking function(s) of XcmH1005 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth* gene family. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 9:105-113
- Zerbib, D., Gamas, P., Chandler, M., Prentki, P., Bass, S., and Galas, D.** (1985) *J. Mol. Biol.* 185, 517-524.

Anexo 1. categoria oficial de genes do genoma de *Xanthomonas citri*

I. Intermediary metabolism

A. Degradation

1. Degradation of polysaccharides and oligosaccharides.
2. Degradation of small molecules.
3. Degradation of lipids.

B. Central intermediary metabolism

1. Amino sugars
2. Entner- Doudoroff
3. Gluconeogenesis
4. Glyoxylate bypass
5. Miscellaneous glucose metabolism
6. Non-oxidative branch, pentose pathway
7. Nucleotide hydrolysis
8. Nucleotide interconversions
9. Phosphorus compounds
10. Pool, multipurpose conversions
11. Sugar-nucleotide biosynthesis, conversions
12. Sulfur metabolism

C. Energy metabolism, carbon

1. Aerobic respiration
2. Anaerobic respiration and fermentation
3. Electron transport
4. Glycolysis
5. Oxidative branch, pentose pathway
6. Pyruvate dehydrogenase
7. TCA cycle
8. ATP-proton motive force interconversion

D. Regulatory functions

1. Two component systems
2. Activators-Repressors
3. Kinases-Phosphatases
4. Sigma factors and other regulatory components
5. Not used.

II. Biosynthesis of small molecules

A. Amino acids biosynthesis

1. Glutamate family | nitrogen assimilation
2. Aspartate family, pyruvate family
3. Glycine-serine family | sulfur metabolism
4. Aromatic amino acid family
5. Histidine

B. Nucleotides biosynthesis

1. Purine ribonucleotides
2. Pyrimidine ribonucleotides

3. 2'-Deoxyribonucleotides
4. Salvage of nucleosides and nucleotides
- C. Sugars and sugar nucleotides biosynthesis
- D. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis
 1. Biotin
 2. Folic acid
 3. Lipoate
 4. Molybdopterin
 5. Pantothenate
 6. Pyridoxine
 7. Pyridine nucleotides
 8. Thiamin
 9. Riboflavin
 10. Thioredoxin, glutaredoxin, glutathione
 11. Menaquinone, ubiquinone
 12. Heme, porphyrin
 13. Biotin carboxyl carrier protein (BCCP)
 14. Cobalamin
 15. Enterochelin.
 16. Biopterin
 17. Others
- E. Fatty acid and Phosphatidic acid biosynthesis
- F. Polyamines biosynthesis

III. Macromolecule metabolism

- A. DNA metabolism
 1. Replication
 2. Structural DNA binding proteins
 3. Recombination
 4. Repair
 5. Restriction, modification
- B. RNA metabolism
 1. Ribosomal and stable RNAs
 2. Ribosomal proteins
 3. Ribosomes- maturation and modification
 4. Aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification
 5. RNA synthesis, modification, DNA transcription
 6. RNA degradation
- C. Protein metabolism
 1. Translation and modification
 2. Chaperones
 3. Protein degradation
- D. Other macromolecules metabolism
 1. Polysaccharides
 2. Phospholipids
 3. Lipoprotein

IV. Cell Structure

A. Membrane components

1. Inner membrane
2. Outer membrane constituents

B. Murein sacculus, peptidoglycan

C. Surface polysaccharides, lipopolysaccharides, and antigens

D. Surface structures

V. Cellular processes

A. Transport

1. Amino acids, amines
2. Anions
3. Carbohydrates, organic acids, alcohols
4. Cations
5. Nucleosides, purines, pyrimidines
6. protein, peptide secretion
7. Other

B. Cell division

C. Chemotaxis and mobility

D. Osmotic adaptation

E. Cell killing

VI. Mobile genetic elements

A. Phage related functions and prophages

B. Plasmid-related functions

C. Transposon- and intron-related functions

VII. Pathogenicity, virulence, and adaptation

A. Avirulence

B. Hypersensitive response and pathogenicity

C. Toxin production and detoxification

D. Host cell wall degradation

E. Exopolysaccharides

F. Surface proteins

G. Adaptation, atypical conditions

H. Others

VIII. Hypothetical

A. Conserved Hypothetical proteins

B. Hypotheticals proteins (include no hits or only low score hits)

C. *Xanthomonas* conserved hypothetical

IX. CDSs with undefined category

ANEXO 2

EZ::TNTM <KAN-2> Transposon (1221 bp)

KAN-2 FP-1 Forward Primer	5' ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC 3'
KAN-2 RP-1 Reverse Primer	5' GCAATGTAAATCAGAGATTGTGAG 3'
ME = Mosaic End	5' AGATGTGTATAAGAGACAG 3'

ANEXO 3

TRANSPOSASE REACTION