

Investigação do papel biológico de β -mananases de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Projeto de Iniciação Científica

Bolsa PIBIC

Orientadora: Dra. Priscila Oliveira de Giuseppe

Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol - CTBE

Campinas

-Abril/2018-

Introdução e Estado da Arte

Bactérias do gênero *Xanthomonas* estão entre os microrganismos invasores de plantas que utilizam um amplo arsenal de hidrolases glicosídicas (GHs) para degradação da parede celular vegetal [1]. Este gênero, em geral, causa doenças a diversos tipos de plantas de interesse comercial. A espécie *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), por exemplo, causa o cancro cítrico, o qual é caracterizado pela formação de lesões circulares com aspecto “*watersoaking*” (lise da célula do hospedeiro com liberação de água e nutrientes para o apoplasto), formando pústulas inicialmente brancas ou amareladas, que se tornam mais amarronzadas e espessas com o avanço da doença [2]. A infecção das plantas por estas bactérias ocorre através dos estômatos e em lesões nas folhas ou ramos, resultando em grandes perdas de produtividade [2].

No genoma de *Xac* são encontrados mais de 100 genes que codificam GHs, das quais menos de 5% já foram caracterizadas [1, 3, 4]. O restante possui identidade de sequência inferior a 40% com proteínas de estrutura conhecida, consistindo num reservatório de potenciais novas estratégias de desconstrução da parede celular vegetal. Devido a sua aplicação na produção de biocombustíveis e outros produtos com alto valor agregado a partir de resíduos agroindustriais, as GHs possuem grande interesse tecnológico. Apesar do interesse primário na celulose, a sustentabilidade econômica da

utilização da biomassa vegetal para produção de etanol e outros produtos químicos é dependente também do desenvolvimento de novas tecnologias para o uso das hemiceluloses, das quais as mananas constituem uma fração significativa [5].

Estudos em andamento feitos pelo nosso grupo de pesquisa identificaram que *Xac* é capaz de crescer em meio mínimo contendo glucomanana como principal fonte de carbono, indicando que ela apresenta um sistema de degradação, captação e utilização dedicado a esse polissacarídeo. Em seu genoma, foram encontrados genes que codificam proteínas potencialmente relacionadas com a degradação de mananas, dentre as quais duas apresentam homologia com β -mananases (XAC1796 e XAC3522). Tais enzimas são alvos de estudos estruturais e bioquímicos de uma das alunas de doutorado do nosso grupo, que visa elucidar o modo de ação das mesmas e avaliar seu potencial biotecnológico. Porém, o papel biológico dessas proteínas bem como sua importância para a patogenicidade de *Xac* ainda são pouco compreendidos.

Assim, para entender a função de XAC1796 e XAC3522 *in vivo*, pretendemos, no presente projeto, produzir bactérias nocaute para esses genes e avaliar a capacidade das mesmas de utilizar a glucomanana como fonte de carbono e de induzir a formação do cancro cítrico. Tais estudos podem contribuir para um melhor entendimento sobre as estratégias moleculares utilizadas por *Xanthomonas spp.* para utilizar carboidratos da parede celular vegetal. Além disso, caso se confirme a relevância desses genes para a patogenicidade de *Xac*, os resultados desse trabalho podem vir a contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle para o cancro cítrico.

Objetivos

Este projeto apresenta como objetivo geral avaliar o papel dos genes XAC3522 e XAC1796 na utilização de glucomanana por *Xanthomonas citri* e na sua patogenicidade. Visto isso, temos como objetivos específicos:

- 1) Fazer o nocaute gênico simples e duplo das duas β -mananases de *Xac* (XAC3522 e XAC1796);
- 2) Construir os vetores de complementação para esses dois genes;
- 3) Avaliar o crescimento em glucomanana e a virulência das bactérias nocauteadas e complementadas.

Metodologia

Produção de bactérias nocaute para determinado gene

Para deleção de genes em *Xac* será utilizada metodologia já descrita [6, 7]. Em resumo, fragmentos de 1000 pb à montante e à jusante do gene de interesse serão amplificados por PCR e ligados um ao outro em fase de leitura. O fragmento de aproximadamente 2000 pares de base será clonado no vetor suicida pNTPS138 e a construção confirmada por sequenciamento de DNA. O plasmídeo recombinante será introduzido em *Xac* por eletroporação e os clones positivos serão selecionados em meio LBON contendo ampicilina (100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) e canamicina (50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). As colônias selecionadas serão plaqueadas em meio LBON contendo ampicilina e canamicina ou ampicilina e 5% sacarose. Colônias sensíveis a canamicina mas que crescerem na presença de sacarose serão selecionadas e testadas por PCR de colônia para a ausência do gene nocauteado. Para confirmar a deleção, o fragmento de DNA referente ao *locus* deletado será amplificado usando os oligonucleotídeos flanqueadores de suas extremidades 5' e 3' e sequenciado usando-se oligonucleotídeos internos. Dois mutantes independentes de cada gene nocauteado serão selecionados e comparados à bactéria selvagem quanto à taxa de crescimento em meio mínimo contendo glucomanana como principal fonte de carbono e a capacidade de induzir a formação de cancro em folhas de laranjeira. Ensaio quantitativo será realizado pelo menos em triplicata e as análises estatísticas serão feitas utilizando o programa Origin8.1 (OriginLab). Ensaio de complementação das bactérias nocaute com os genes de interesse clonados em plasmídeo pLAL6 [8] serão realizados para se validar a relação causal entre o gene nocauteado e o fenótipo observado.

Produção de vetores de complementação

Para a produção dos vetores de complementação, as ORFs XAC1796 e XAC3522 serão amplificadas a partir do DNA genômico da linhagem 306 de *Xac* por PCR, clonada em vetor PGEM e subclonada em plasmídeo pLAL6 [8] utilizando protocolos de biologia molecular padrões descritos em manuais de laboratório [9]. Clones positivos serão validados por sequenciamento de DNA.

Curvas de crescimento

O crescimento das bactérias selvagem, nocaute e complementadas será monitorado pela medida da DO_{600nm} de culturas de bactérias crescidas a 30 °C em meio mínimo na presença de glucomanana. Os inóculos serão realizados em triplicata a partir de pré-culturas crescidas durante a noite, lavadas, ressuspensas em meio mínimo e quantificadas para o preparo de inóculos iniciais com DO_{600nm} a 0,1. Os inóculos serão agitados continuamente a 200 rpm e mantidos a 30 °C.

Infiltração bacteriana em folhas de laranjeira

Ensaio *in planta* serão realizados por infiltração em folhas de laranja (*Citrus sinensis*) das cepas de *Xac* em estudo, de acordo com metodologias já descritas [6, 10, 11]. Em resumo, bactérias selvagens (controle positivo), nocautes para o gene de interesse e complementadas serão crescidas por 48 h a 30 °C em meio LBON contendo ampicilina. Em seguida, elas serão suspensas em água, diluídas serialmente e plaqueadas para se estimar a concentração de células. Folhas de laranjeira serão infiltradas com 0,1 ml de uma suspensão de *Xac* contendo aproximadamente 10⁵ ou 10⁶ células.ml⁻¹ e posteriormente avaliadas quanto a presença de sintomas de cancro como descrito em [12]. Basicamente, as plantas serão mantidas em casa de vegetação com temperatura controlada (28°C), por período de tempo desejado e, então, folhas infectadas serão removidas para análises. A progressão e perfil das lesões do cancro originadas pelas cepas de *Xac* serão observadas em microscópio óptico invertido.

Referências Bibliográficas

1. Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol.* 1997;7:637-44.
2. Brunings AM, Gabriel DW. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Mol Plant Pathol.* 2003;4:141-57.

3. Santos CR, Hoffmam ZB, de Matos Martins VP, Zanphorlin LM, de Paula Assis LH, Honorato RV, Lopes de Oliveira PS, Ruller R, Murakami MT. Molecular mechanisms associated with xylan degradation by *Xanthomonas* plant pathogens. *J Biol Chem*. 2014;289:32186-200.
4. Feng T, Yan KP, Mikkelsen MD, Meyer AS, Schols HA, Westereng B, Mikkelsen JD. Characterisation of a novel endo-xyloglucanase (XcXGHA) from *Xanthomonas* that accommodates a xylosyl-substituted glucose at subsite -1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98:9667-79.
5. Ishii J, Okazaki F, Djohan AC, Hara KY, Asai-Nakashima N, Teramura H, Andriani A, Tominaga M, Wakai S, Kahar P *et al*. From mannan to bioethanol: cell surface co-display of beta-mannanase and beta-mannosidase on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9:188.
6. Souza DP, Andrade MO, Alvarez-Martinez CE, Arantes GM, Farah CS, Salinas RK. A component of the *Xanthomonadaceae* type IV secretion system combines a VirB7 motif with a N0 domain found in outer membrane transport proteins. *PLoS pathogens*. 2011;7:e1002031.
7. Tofoli de Araujo F, Bolanos-Garcia VM, Pereira CT, Sanches M, Oshiro EE, Ferreira RC, Chigardze DY, Barbosa JA, de Souza Ferreira LC, Benedetti CE *et al*. Structural and physiological analyses of the alkanesulphonate-binding protein (SsuA) of the citrus pathogen *Xanthomonas citri*. *PloS one*. 2013;8:e80083.
8. Martins PM, Lau IF, Bacci M, Belasque J, do Amaral AM, Taboga SR, Ferreira H. Subcellular localization of proteins labeled with GFP in *Xanthomonas citri* ssp. *citri*: targeting the division septum. *FEMS microbiology letters*. 2010;310:76-83.
9. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
10. Vanini MM, Spisni A, Sforca ML, Pertinhez TA, Benedetti CE. The solution structure of the outer membrane lipoprotein OmlA from *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* reveals a protein fold implicated in protein-protein interaction. *Proteins*. 2008;71:2051-64.
11. Soto-Suarez M, Bernal D, Gonzalez C, Szurek B, Guyot R, Tohme J, Verdier V. In planta gene expression analysis of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*, African strain MAI1. *BMC microbiology*. 2010;10:170.
12. Soprano AS, Abe VY, Smetana JH, Benedetti CE. Citrus MAF1, a repressor of RNA polymerase III, binds the *Xanthomonas citri* canker elicitor PthA4 and suppresses citrus canker development. *Plant physiology*. 2013;163:232-42.