

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

CAMILA ESCOBAR CANDIDO

**CONSTRUÇÃO DE VETOR PLASMIDIAL PARA DELEÇÃO GÊNICA
DA ORF XAC3162 DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri***

SÃO CARLOS

2023

CAMILA ESCOBAR CANDIDO

**CONSTRUÇÃO DE VETOR PLASMIDIAL PARA DELEÇÃO GÊNICA
DA ORF XAC3162 DE *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur

Co-orientador: Dr. Leandro Seiji Goto

SÃO CARLOS

2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos e protetores, que cuidaram de mim como em uma aldeia.

À Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, pela orientação, disposição, compreensão, dedicação e disponibilidade.

Ao Dr. Leandro Seiji Goto, pelos ensinamentos, compartilhamentos e reflexões sobre este trabalho e sobre política.

Ao Dr. Vinícius Marquioni Monteiro, pelo auxílio, acolhimento, naturalidade e empatia.

Ao Dr. André Vessoni Alexandrino, pela disponibilidade em ajudar e aconselhar.

À minha mãe, Elaine, por sempre ter buscado exaustivamente o melhor para mim, apesar de todos os desafios, e por ter me ensinado a observar as cascas das árvores.

Ao meu tio, Osvaldo, pela confiança e apoio em momentos tão desesperadores e cruciais.

Às minhas amigas, pelo apoio, gentileza e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Joelson Gonçalves de Carvalho, pelas aulas e esperança.

À FAPESP e CAPES, pelo auxílio financeiro aos projetos do laboratório.

RESUMO

O cancro cítrico é uma doença bacteriana causada por *Xanthomonas citri* (XAC), a qual afeta todas as espécies de citros e causa prejuízos à qualidade e produtividade dos frutos. Em 2022, no Brasil, maior produtor mundial de laranja, a doença apresentou alta taxa de disseminação. A produção de β -lactamases por XAC pode contribuir para a defesa contra microrganismos, incluindo endofíticos, que podem secretar antibióticos β -lactâmicos. A ORF XAC3162, que codifica uma β -lactamase, é um gene interessante para investigação de sua possível contribuição para a patogenicidade em XAC. Este trabalho teve como objetivo construir um vetor para deleção do gene XAC3162 do genoma de XAC por dupla recombinação homóloga com vetor suicida. As regiões *upstream* e *downstream* de 1kb da ORF XAC3162 foram clonadas no vetor pJET1.2 para propagação e subclonadas *in tandem* no vetor suicida pNPTS138, o qual codifica resistência à canamicina. A construção do vetor foi realizada com sucesso, conforme indicado pela digestão enzimática seguida por SDS-PAGE. A eletroporação de XAC não forneceu transformantes resistentes à canamicina, apesar de várias tentativas em diferentes condições. Mais investigações serão futuramente necessárias para elucidar o motivo pelo qual o gene XAC3162 é refratário à deleção por recombinação homóloga.

Palavras-chave: *Xanthomonas citri* subsp *citri*. XAC3162. Recombinação homóloga.

ABSTRACT

Citrus canker is a bacterial disease caused by *Xanthomonas citri* (XAC), which affects all citrus species and causes damage to fruit quality and productivity. In 2022, in Brazil, the world's largest producer of oranges, the disease presented a high rate of dissemination. The production of β -lactamases by XAC may contribute to its defense against microorganisms, including endophytes, which can secrete β -lactam antibiotics. The gene XAC3162, which is annotated as a β -lactamase in XAC, is an interesting gene to investigate its possible contribution to XAC pathogenicity. This work aimed to obtain a recombinant vector for deletion of XAC3162 gene from XAC genome by double homologous recombination. The 1 kb upstream and downstream regions of the XAC3162 gene were cloned into the pJET1.2 vector for propagation and subcloned in tandem into the suicide vector pNPTS138, which encodes for kanamycin resistance. Vector construction was successfully performed, as indicated by enzymatic digestion followed by SDS-PAGE. Electroporation of XAC did not yield kanamycin-resistant transformants, despite of several attempts performed under different conditions. More investigations will be needed in the future to elucidate why XAC3162 gene is refractory to deletion by homologous recombination.

Keywords: *Xanthomonas citri* subsp *citri*. XAC3162. Homologous recombination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Consequências do cancro cítrico às plantas cítricas: da esquerda para a direita, depreciação da qualidade de folhas e frutos e queda prematura da produção.	10
Figura 2 - Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos.....	12
Figura 3 - Esquema da formação da parede celular. A parede celular bacteriana consiste em cadeias de subunidades repetidas de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM).....	13
Figura 4 - Mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos: A: Inibição da formação da parede celular; B: Ativação de endolisinas.....	13
Figura 5 - Hidrólise do anel β -lactâmico por uma β -lactamase.....	14
Figura 6 - Oligonucleotídeos específicos para amplificação de regiões de 1kb upstream e downstream à ORF XAC3162.....	18
Figura 7 - Eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%) das reações de digestão enzimática dos vetores de propagação pJET1.2_Up e pJET1.2_Down.....	25
Figura 8 - Representação gráfica da construção do vetor de deleção, pNPTS_Bla1.	26
Figura 9 - Análise de restrição enzimática do vetor de deleção pNPTS_Bla1 em gel de TAE agarose (0,8%).....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da reação de PCR para amplificação dos fragmentos <i>upstream</i> e <i>downstream</i> à ORF XAC3162.....	19
Tabela 2 - Condições da reação de PCR para amplificação dos fragmentos <i>upstream</i> e <i>downstream</i> à ORF XAC3162.....	19
Tabela 3 - Reações de digestão dos vetores pJET1.2_Up e pJET1.2_Down.....	20
Tabela 4 - Parâmetros utilizados nas eletroporações para transformação de XAC...	28

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AmpR	Resistência à ampicilina
CN	Caldo nutriente
CVC	Clorose variegada dos citros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
kb	quilo pares de bases
kg	kilogramas
LB	Lúria-Bertani
mL	mililitro
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	N-acetilmurâmico
mm	milímetro
ng	nanograma
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
pb	pares de base
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
rpm	Rotações por minuto
TAE	Tris-acetato-EDTA
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
V	Volt
XAC	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>
μF	microfarad
μg	micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	CANCRO CÍTRICO.....	9
1.2	XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI.....	11
1.3	ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS E B-LACTAMASES.....	12
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	LINHAGENS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	17
3.2	PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	17
3.3	DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDIOS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES <i>UPSTREAM</i> E <i>DOWNSTREAM</i> À ORF XAC3162.....	17
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DA XAC.....	18
3.5	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS <i>UPSTREAM</i> E <i>DOWNSTREAM</i> À ORF XAC3162.....	18
3.6	PROPAGAÇÃO DOS FRAGMENTOS <i>UPSTREAM</i> E <i>DOWNSTREAM</i> À ORF XAC3162.....	19
3.7	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE DELEÇÃO PNPTS138.....	21
3.8	CONFIRMAÇÃO DA MONTAGEM DO VETOR DE DELEÇÃO PNPTS_BLA1.....	22
3.9	TRANSFORMAÇÃO DE XAC POR ELETROPORAÇÃO.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS <i>UPSTREAM</i> E <i>DOWNSTREAM</i> À ORF XAC3162.....	24
4.2	CONSTRUÇÃO DO VETOR DE DELEÇÃO PNPTS138.....	25
4.3	TRANSFORMAÇÃO DE XAC POR ELETROPORAÇÃO.....	27
5	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31
	ANEXO A – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO VETOR DE PROPAGAÇÃO PJET1.2.....	35
	ANEXO B – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO VETOR SUICIDA PNPTS138	36

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, sendo esta a fruta mais cultivada do país, e detém 34% da laranja e mais de 50% de suco de laranja produzidos em todo o mundo (ERPEN et al., 2018; NEVES; TROMBIN, 2017). O cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro apresenta 344,389 hectares de área de cultivo e um total de 169,97 milhões de árvores produtivas, o que lhe confere a maior produção de laranja para suco do mundo (FUNDECITRUS, 2022c).

Na safra de 2021/2022, o cinturão citrícola produziu cerca de 262,97 milhões de caixas com 40,8 kg de laranja cada e a estimativa para a safra da laranja 2022/2023 é de 316,95 milhões de caixas, volume 20,53% maior do que a safra anterior e 1,11% maior do que a média dos últimos dez anos. Estes dados indicam uma recuperação geral dos pomares perante as adversidades climáticas recentes, incluindo a seca e a geada de 2020 e 2021, responsáveis por duas safras pequenas consecutivas e a consequente descontinuidade do ciclo bienal de produção, caracterizada pela alternância anual entre safras altas e baixas ([FUNDECITRUS, 2022a](#)).

O tamanho das safras e a produtividade por hectare também são impactados por doenças da laranja, como Greening, Clorose variegada dos citros(CVC) e cancro cítrico. O cancro cítrico ocorre em todos os setores do cinturão citrícola e tem seus impactos relacionados à desfolha de plantas, à queda da qualidade da produção pela presença de lesões em frutos, à queda de frutos antes da colheita e à restrição da comercialização da produção (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2019).

A doença, em 2022, esteve presente em 24,70% dos talhões e em 18,77% das árvores, índices, respectivamente, 58% e 74,44% superiores ao ano anterior e está mais disseminada no cinturão citrícola do que em qualquer momento desde sua primeira decretação em 1957. A incidência aumentou em todos os setores, regiões, tamanhos de propriedade e idade de pomar, inclusive em setores e regiões nos quais, historicamente, a doença estava ausente ou presente em baixos níveis. Tal aumento já era esperado devido ao encerramento do programa de erradicação da doença, em 2017, e adoção do sistema de mitigação de risco como medida oficial de enfrentamento, no qual são integradas diferentes medidas de manejo de risco e que

permite a manutenção de plantas sintomáticas nos pomares (BRASIL, 2018; FUNDECITRUS, 2022b).

1.1 CANCRO CÍTRICO

O cancro cítrico provavelmente originou-se no sudeste da Ásia, centro de origem dos citros (FAWCETT, 1936). No Brasil, foi identificado pela primeira vez na cidade de Prudente, estado de São Paulo, em 1957, tendo sido provavelmente introduzido por meio de material propagativo de citros contaminados vindo do Japão (BITANCOURT, 1957). Nos anos seguintes, foi disseminado para outros municípios paulistas, para o estado de Mato Grosso do Sul e região sul do país, na qual hoje se encontra endêmico (FUNDECITRUS, 2012; LEITE JÚNIOR; MOHAN, 1990; NAMEKATA, 1999).

O agente etiológico é a bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Este gênero de bactérias produz goma xantana a qual facilita sua dispersão e sobrevivência, gerando um aspecto viscoso e amarelado quando cultivado em laboratório em meio contendo ágar (VAUTERIN; YANG; SWINGS, 1996). As espécies de *Xanthomonas fuscans* subsp. *aurantifolii* e *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis* também são identificadas como agentes causais de doenças em citros. A primeira, relatada apenas na América do Sul, age em *Citrus aurantifolia* e *C. latifolia* e em limões verdadeiros (*C. limon*). São conhecidos dois patótipos de *Xanthomonas fuscans subsp. aurantifolii*, o patótipo B, descrito na Argentina, Uruguai e Paraguai e o patótipo C, descrito exclusivamente em São Paulo. Ambos são de ocorrência relativamente rara e não possuem importância econômica para a produção de citros. A *X. alfalfae subsp. citrumelonis* é endêmica da Flórida e agente causal da mancha bacteriana, também conhecida como cancrose E, em citrumeleiros. Há também a cancrose D, ainda não satisfatoriamente caracterizada e presente no México (LARANJEIRA et al., 2005; SCHUBERT et al., 2001).

O cancro cítrico não acarreta a morte da árvore doente e seus sintomas ocorrem de maneira semelhante em folhas, frutos e ramos (Figura 1). No entanto, o maior impacto da doença é a queda de prematura dos frutos, que pode atingir até 80% em casos graves (BEHLAU; SALA; BASSANEZI, 2019).

Nas folhas, a doença tornam-se visível em duas a cinco semanas após a infecção. No início, formam-se pontos escurecidos, possivelmente com halos amarelados, resultado da multiplicação da bactéria e encharcamento do tecido vegetal com evolução para pústulas de coloração marrom-clara. As lesões são observadas primeiro na face inferior e com o progresso da doença, tornam-se salientes e visíveis em ambos os lados da folha.

Os frutos são suscetíveis à infecção durante os primeiros quatro meses após a queda de pétalas. As lesões ocorrem mais comumente na parte voltada para o exterior da copa das plantas devido à sua maior exposição a chuvas e ventos. À medida que ocorre o aumento da área afetada, as lesões em frutos podem apresentar anéis circulares e rachaduras.

As lesões nos ramos, apesar de sua baixa frequência, são importantes para a sobrevivência da doença no pomar, pois permanecem na planta por vários anos. Podem resultar em rachaduras, que levam à seca do ramo e prejudicam o seu desenvolvimento, sobretudo nos primeiros anos da planta (BEHLAU; BELASQUE JÚNIOR, 2014).

Figura 1 - Consequências do cancro cítrico às plantas cítricas: da esquerda para a direita, depreciação da qualidade de folhas e frutos e queda prematura da produção.



Fonte: Behlau; Belasque Júnior, 2014.

A disseminação do cancro cítrico ocorre principalmente por ação de chuvas associadas a vento, e também por intermédio do ser humano através do transporte de utensílios, equipamentos e mudas contaminadas. O cancro cítrico não é disseminado por insetos, não necessitando de qualquer vetor (BEHLAU; BELASQUE JÚNIOR, 2014; OLIVEIRA et al., 2008).

O diagnóstico feito por sintomatologia é suficiente para a maioria das situações associadas ao manejo do cancro cítrico no campo (SCHUBERT et al., 2001). Entretanto, a eliminação de plantas e pomares, a confirmação da doença em

áreas livres, a liberação do comércio de frutos para áreas livres ou sob erradicação/supressão da doença exigem o uso de técnicas laboratoriais, como a corrida ou fluxo bacteriano, isolamento em meio de cultura, testes de patogenicidade, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e sorologia (BEHLAU; BELASQUE JÚNIOR, 2014).

1.2 XANTHOMONAS CITRI SUBSP. CITRI

O gênero *Xanthomonas* compreende um grupo de 27 bactérias fitopatogênicas Gram negativas capazes de infectar cerca de 400 espécies vegetais (RYAN et al, 2011). São bactérias em formato de bastonetes, aeróbicas, não fixadoras de nitrato, não esporogênicas, com um único flagelo polar e que apresentam como condições ótimas para sobrevivência a alta umidade e temperatura entre 20°C e 39°C (BEDENDO; AMORIM, 2011). A goma xantana é um polissacarídeo produzido por *Xanthomonas* spp. amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, petroquímica, química e farmacêutica como espessante, estabilizante e gelificante (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

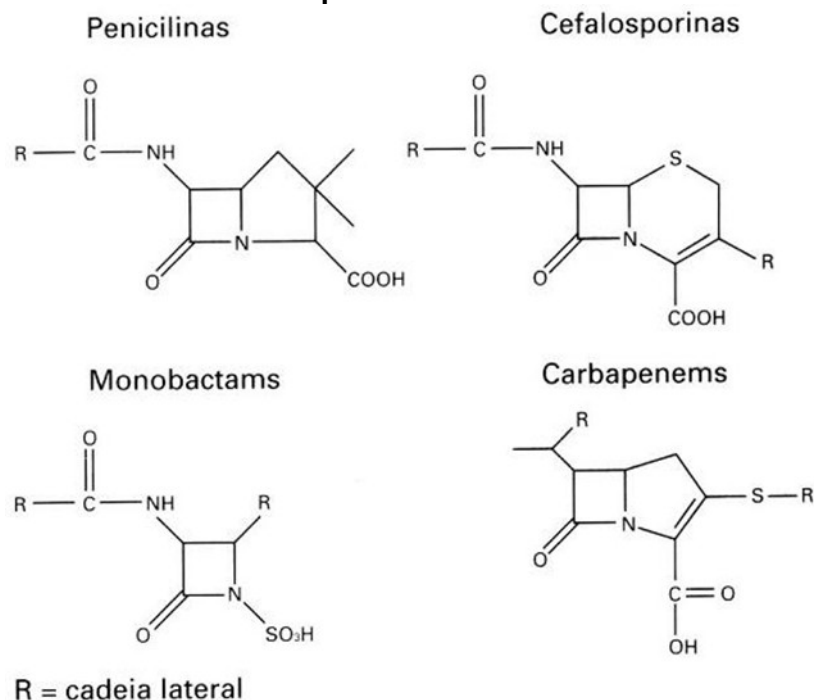
A bactéria *X. citri* subsp. *citri* (XAC) é o agente etiológico do cancro cítrico e patogênica a todas as variedades comerciais de citros (FAWCETT; BITANCOURT, 1940). Todo o seu genoma foi sequenciado, sendo constituído por um cromossomo de 5,27 Mb e os plasmídeos pXAC64 e pXACC33 (SILVA et al., 2002).

Este fitopatógeno penetra no tecido vegetal do hospedeiro através de aberturas naturais ou por ferimentos e multiplicam-se nos espaços intercelulares produzindo polissacarídeos extracelulares (GRAHAM et al., 1992; GRAHAM et al., 2004). A diminuição dos espaços intracelulares e acúmulo de goma xantana, altamente higroscópica, são responsáveis pelo aspecto encharcado no tecido (PADMANABHAN; VIDHYASEKARAN; RAJAGOPALAN, 1973). A XAC pode sobreviver anos em tecidos infectados mantidos secos, sem contato com o solo ou luz solar (GOTO, 1992).

1.3 ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS E B-LACTAMASES

Os β -lactâmicos são antibióticos definidos pela presença do anel β -lactâmico, constituído por três átomos de carbono e um de nitrogênio. De acordo com os diferentes tipos de anéis fundidos ao anel β -lactâmico, esta família de antibióticos classifica-se em 4 classes com características, espectros de ação e resistência à β -lactamases diferentes (SOUSA, 2006). As penicilinas apresentam um anel tiazolidina, as cefalosporinas um anel dihidrotiazina, os carbapenemos um anel pirrólico e os monobactâmicos não apresentam anel adicional fundido ao anel principal (Figura 2) (WILLIAMS, 1999).

Figura 2 - Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos.

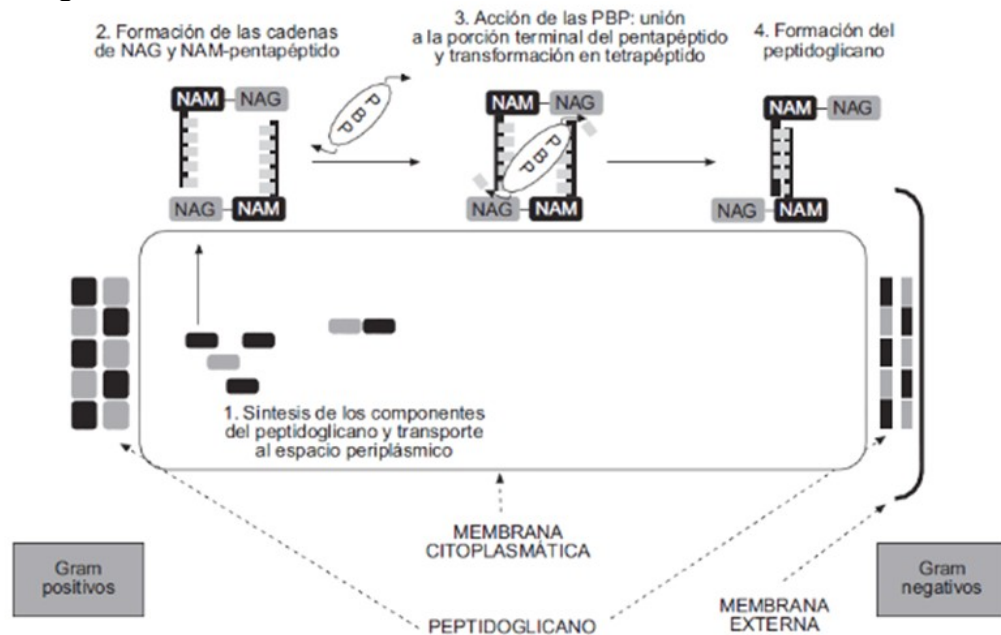


Fonte: Williams, 1999.

Os antibióticos β -lactâmicos são inibidores irreversíveis da proteína bacteriana que se liga à penicilina (PBP - *penicillin binding protein*), cuja ação é ligar covalentemente duas cadeias de N-acetilmurâmico (NAM) para a formação do peptidoglicano presente nas paredes celulares bacterianas. (Figura 3). A perturbação na síntese do peptidoglicano compromete o equilíbrio osmótico da bactéria e, conseqüentemente, tem como resultado o rompimento celular (Figura 4) (DRAWZ; BONOMO, 2010). Adicionalmente, eles também agem na ativação das autolisinas

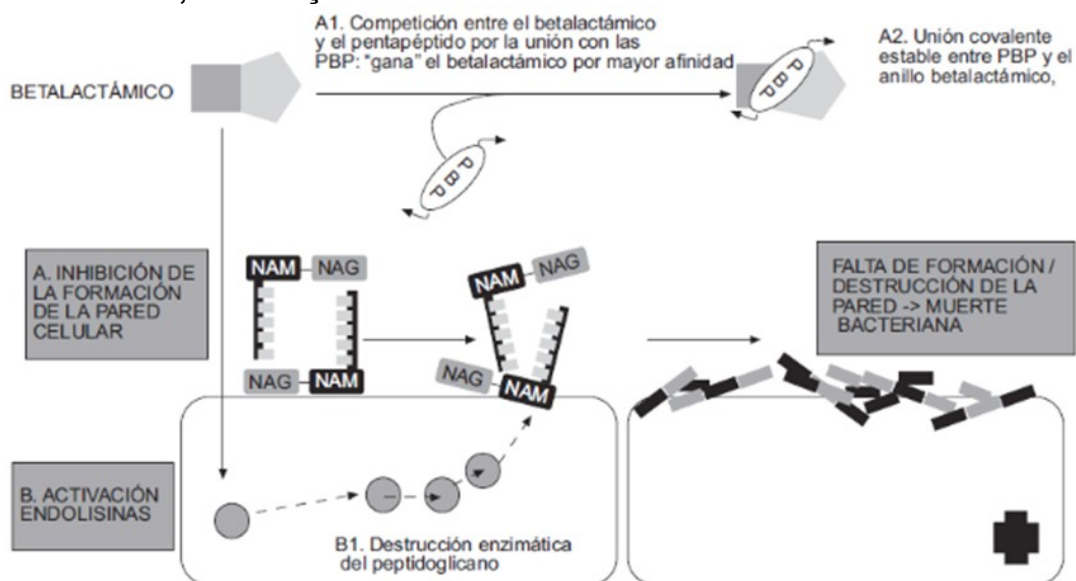
bacterianas endógenas, desencadeando a destruição enzimática do peptidoglicano (SUAREZ; GUDIOL, 2009).

Figura 3 - Esquema da formação da parede celular. A parede celular bacteriana consiste em cadeias de subunidades repetidas de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM). As subunidades NAM têm cadeias peptídicas ligadas a elas. As PBP unem as porções terminais destas cadeias peptídicas resultando na formação do peptidoglicano.



Fonte: Suarez; Gudiol, 2009.

Figura 4 - Mecanismo de ação dos antibióticos β -lactâmicos: A: Inibição da formação da parede celular; B: Ativação de endolisinas.

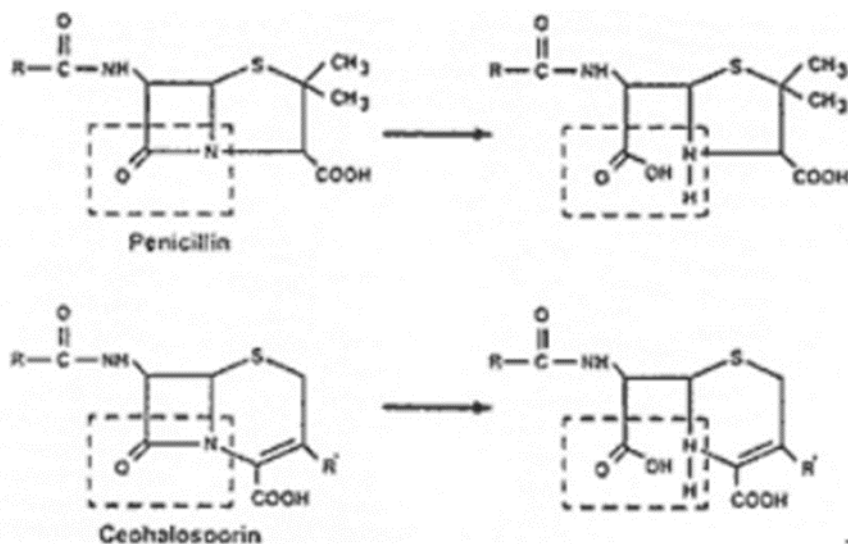


NAM: Ácido N-acetilmurâmico; NAG: Ácido N-acetilglucosamina; PBP: Penicillin Binding Protein

Fonte: Suarez e Gudiol, 2009.

O principal mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos β -lactâmicos é a hidrólise do anel β -lactâmico pelas enzimas β -lactamases através da quebra da ligação amida (Figura 5). Estas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos como plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou induzido. Podem ser encontradas extracelularmente em bactérias Gram-positivas e no espaço periplasmático de bactérias Gram-negativas (WILLIAMS, 1999).

Figura 5 - Hidrólise do anel β -lactâmico por uma β -lactamase.



Fonte: Zeba, 2005.

Apesar de todas catalizarem a mesma reação, as β -lactamases são distribuídas em quatro classes por sua estrutura primária (AMBLER, 1980). As classes A, C e D formam uma ligação acil entre um resíduo de serina no sítio ativo e o substrato e englobam, respectivamente, as penicilases, as β -lactamases do tipo AmpC e as oxacilinas. A classe B engloba as metalo- β -lactamases e utiliza íons divalentes, comumente zinco, como co-fator (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008).

No gênero *Xanthomonas*, as β -lactamases estão presentes em várias espécies, entretanto, há pouca literatura sobre sua presença em XAC (WENG et al., 1999). No genoma da XAC são encontradas quatro ORFs (*Open Reading Frames*) que codificam β -lactamases, sendo elas XAC0134, XAC2806, XAC3057 e XAC3162. Dentre todas, a ORF XAC3162 é a única que apresenta peptídeo sinal previsível, indicando ser uma proteína de exportação, ausência de domínio estrutural de função

desconhecida e presença *upstream* de uma sequência identificada como “ativador transcricional da família AmpR”, sugerindo que esta ORF é aparentemente funcional e com expressão regulada (CASSARO, 2017). O gene *bla*, referente à ORF XAC3162, está localizado na fita complementar do DNA da XAC (3714683-3715576)

É possível que a presença de β -lactamase favoreça a sobrevivência de XAC por possibilitar a defesa contra microrganismos, incluindo endofíticos, que possam secretar antibióticos β -lactâmicos e, portanto, estar relacionada com o desenvolvimento do cancro cítrico. Devido a essa possibilidade e à carência de informações sobre β -lactamases em XAC, a ORF XAC3162 foi escolhida para o presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivos construir um vetor recombinante para fins de deleção gênica da ORF XAC3162.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Construir os vetores de propagação para os fragmentos de interesse utilizando o vetor pJET1.2/blunt.

Construir o vetor de deleção da ORF XAC3162 por clonagem “*in tandem*” no vetor suicida pNPTS138 dos fragmentos de 1 kb que ladeiam a ORF no genoma.

Confirmar a construção plasmidial por análise enzimática após transformar e propagar em *E.coli*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem de *X. citri* subsp. *citri* 306 (XAC306) foi cedida pelo Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus). As bactérias foram estocadas à -80°C em meio líquido Lúria-Bertani (LB) (Sigma), adicionado de glicerol 50%.

O crescimento em meio sólido foi realizado em meio ágar-LB (Sigma) em estufa a 28°C por cerca de 60 horas. O cultivo em meio líquido foi realizado em meio LB a 28°C e 250 rpm por cerca de 24 horas ou até apresentar turbidez.

A linhagem de *Escherichia coli* DH5 α foi estocada a -80°C em meio LB adicionado de glicerol 50%. A reativação da linhagem foi realizada em meio sólido por estriamento da cultura-estoque em meio ágar-LB (Sigma), seguido de incubação a 37°C durante 24 horas. O crescimento em meio líquido foi realizado *overnight* em meio LB a 37°C e 250 rpm.

3.2 PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Todas as técnicas de biologia molecular foram realizadas de acordo com protocolos padronizados (AUSUBEL, 1994) ou então como detalhadas.

3.3 DESENHO DE OLIGONUCLEOTÍDIOS PARA AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES *UPSTREAM* E *DOWNSTREAM* À ORF XAC3162.

Foram desenhados oligonucleotídeos específicos para amplificação de regiões de 1kb *upstream* e *downstream* à ORF XAC3162, utilizando-se o genoma da XAC306 depositado no *GenBank*, código de acesso NC_003919. Todos os oligonucleotídeos possuem sítios de restrição para endonucleases, as quais foram escolhidas por possuírem sequências de clivagem que não estejam presentes nos produtos alvo e estejam presentes no vetor. O *software OligoAnalyzer* 3.1 foi utilizado para otimização dos oligonucleotídeos, procurando evitar a formação de superestruturas indesejáveis como *hairpins* (pareamento de bases intramolecular)

homodímeros (pareamento de bases em oligonucleotídeos idênticos) e heterodímeros (pareamento de bases entre o *Foward* e o *Reverse* de um mesmo par de oligonucleotídeos). O *software* NCBI Blastn foi utilizado para confirmação de que os oligonucleotídios hibridizariam somente na região desejada do genoma da XAC306.

Figura 6 - Oligonucleotídeos específicos para amplificação de regiões de 1kb upstream e downstream à ORF XAC3162.

```

UPBla1FW
HindIII
5' - A↓AGCTTgcgccctaagcgcggcagtg          tm 66.1° C

UPBla1RV
BamHI
5' - G↓GATCCgcggttgctccttgagagagcc        tm 66.1° C

DOWNBla1FW
BamHI
5' - G↓GATCCgtgcaaccgccgactgttttcca       tm 65.6° C

DOWNBla1RV
EcoRI
5' - G↓AATTCgccgtgcagcttgagctgcagc       tm 65.1° C

```

Fonte: própria autora.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DA XAC

O DNA genômico de células de XAC306 foi obtido anteriormente por nosso grupo de pesquisa (ALEXANDRINO, 2020). Resumidamente, as células de XAC306 foram cultivadas em 500 mL de caldo nutriente (CN), centrifugadas e lavadas três vezes com PBS (Tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4; 150mM NaCl). Cerca de 0,1g da massa celular resultante foi utilizado na extração de DNA genômico por meio do *kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega).

3.5 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS *UPSTREAM* E *DOWNSTREAM* À ORF XAC3162

A obtenção dos fragmentos flanqueadores *upstream* e *downstream* à ORF XAC3162 foi realizada por meio de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) em

termociclador C1000 Touch (Bio-Rad). Os componentes e condições das reações para a amplificação dos fragmentos estão descritos na **Tabela 1** e **Tabela 2**, respectivamente.

Tabela 1 - Composição da reação de PCR para amplificação dos fragmentos *upstream* e *downstream* à ORF XAC3162.

Componente	Volume (μL)
5x Phusion Green HF Buffer	10
Water Nuclease Free	28
DNA genômico de XAC306 (25 ng/ μL)	8
Oligonucleotídeo <i>Reverse</i> (100 pMol)	1
Oligonucleotídeo <i>Foward</i> (100 pMol)	1
Mix de dNTP 10 mM	1
Enzima Taq DNA Polimerase (2 U/ μL)	1
Total	50

Fonte: própria autora.

Tabela 2 - Condições da reação de PCR para amplificação dos fragmentos *upstream* e *downstream* à ORF XAC3162. As três etapas destacadas na cor cinza compõem um ciclo, o qual foi repetido 35 vezes após a etapa de desnaturação inicial e antes da etapa de extensão final.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Duração
Desnaturação inicial	98	10 min
Desnaturação	98	30 s
Hibridização	66	30 s
Extensão	72	90 s
Extensão final	72	10 min

Fonte: própria autora.

Após amplificação, os fragmentos foram submetidos a eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%) contendo brometo de etídeo. Posteriormente, as bandas correspondentes à 1000 pb foram recortadas com auxílio de bisturi e os fragmentos foram purificados com o uso do *kit GeneJet Gel Extraction (Thermo Scientific)*. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro *NanoVue (Ge Healthcare)*.

3.6 PROPAGAÇÃO DOS FRAGMENTOS *UPSTREAM* E *DOWNSTREAM* À ORF XAC3162

Cada inserto purificado foi clonado individualmente no vetor de propagação pJET1.2/blunt (ANEXO A), utilizando o *kit CloneJet PCR Cloning (Thermo Scientific)* e seguindo a razão molar de 3:1 (inserto:vetor). Este vetor confere resistência à ampicilina e também possui gene codificante para a enzima letal *eco47IR*, cuja sequência é interrompida pela inserção do fragmento. Posteriormente, células de *E. coli* DH5 α competentes tratadas com cloreto de cálcio (AUSUBEL, 1994) foram transformadas individualmente com os vetores de propagação obtidos nas reações de ligação, denominados pJET1.2_Up e pJET1.2_Down. Após a transformação, as células foram semeadas em meio ágar-LB contendo ampicilina 50 μ g/mL mantidas à 37 °C por 24 horas.

Uma colônia de cada placa foi selecionada e repicada em meio LB líquido contendo a mesma concentração de ampicilina, sendo mantida sob agitação a 37°C *overnight*. A cultura resultante foi utilizada para extração do DNA plasmidial com o *kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Scientific)* e também para estocagem das células à -80°C com glicerol 50%. Após a extração do DNA, as amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro *NanoVue (Ge Healthcare)*.

Posteriormente, foram realizadas reações de digestão enzimática a fim de obter os fragmentos *upstream* e *downstream*. A composição das reações, mantidas a 37°C *overnight*, está descrita na **Tabela 3**. O conteúdo das reações de digestão enzimática foram submetidos a eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%) contendo brometo de etídeo e purificados com o uso do *GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific)*. Os fragmentos purificados foram quantificados por espectrofotômetro *NanoVue (Ge Healthcare)*.

Tabela 3 - Reações de digestão dos vetores pJET1.2_Up e pJET1.2_Down. Na reação de digestão utilizada para a obtenção do fragmento upstream foram utilizadas as enzimas de restrição HindIII e BamHI e na reação referente ao fragmento downstream foram utilizadas as enzimas de restrição BamHI e EcoRI.

Componente	Volume (μL)
pJET_UP ou pJET_DOWN	10
Enzima de restrição 1 (<i>HindIII</i> ou <i>BamHI</i>) (100 U/ μL)	1
Enzima de restrição 2 (<i>BamHI</i> ou <i>EcoRI</i>) (100 U/ μL)	1
Água Mili-Q	6
<i>FastDigest Green Buffer</i> 10x	2

Fonte: própria autora.

Preparou-se amostras de ambos os fragmentos para sequenciamento, o qual foi realizado pela empresa *Myleus Biotechnology*. As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1. A análise da correspondência entre as sequências obtidas e as esperadas, disponíveis no genoma (NCBI), foi feita por meio do *software Ugene*.

3.7 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE DELEÇÃO pNPTS138

A deleção do gene alvo foi realizada utilizando-se o vetor suicida pNPTS138 (ANEXO B), cedido ao nosso grupo de pesquisa pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira (Unesp, Rio Claro-SP) (ALEXANDRINO, 2020). Este vetor confere às células resistência à canamicina e, devido à presença do gene *sacB* (*Bacillus subtilis*) codificante da enzima levansacarose, intolerância à sacarose pela conversão da sacarose em levana, um produto tóxico para a célula (GAY et al., 1985). Por não possuir capacidade replicativa em XAC, o vetor somente permanece nas bactérias se integrar-se ao seu genoma.

Primeiramente, o vetor pNPTS138 foi digerido com as endonucleases *BamHI* e *EcoRI*, específicas para a clonagem do fragmento *downstream* e purificado em gel de TAE agarose (0,8 %) com brometo de etídeo. Posteriormente foi feita ligação entre este vetor e o fragmento *downstream* purificado através de reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA Ligase. O conteúdo desta reação foi utilizado para transformação em células de *E.coli* DH5 α . Após o cultivo das células transformadas em meio ágar-LB adicionado de canamicina à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, uma colônia foi escolhida e

propagada em meio LB líquido com canamicina na mesma concentração. Realizou-se então a extração do plasmídeo por meio do kit *Fast-n-Easy Plasmid MiniPrep Kit* (Cellco) e digestão do mesmo com as endonucleases *Bam*HI e *Hind*III, a fim de possibilitar a ligação do fragmento *upstream*.

A reação de digestão foi submetida a eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%) para obtenção do vetor plasmidial. O vetor foi utilizado em reação de ligação com o fragmento *upstream* utilizando a enzima T4 DNA Ligase. A seguir, células de *E.coli* DH5 α foram transformadas e propagadas em meio LB sólido adicionado de canamicina à 40 μ g/mL. Após o crescimento de colônias, uma colônia foi selecionada para cultivo em LB líquido adicionada de canamicina à 40 μ g/mL. Tal cultivo foi utilizado para a extração do plasmídeo com o uso do kit *Fast-n-Easy Plasmid MiniPrep* (Cellco) e quantificação em *espectrofotômetro NanoVue* (GePro Healthcare). Também foi feita a estocagem das células utilizando-se de glicerol (50%) à -80°C.

3.8 CONFIRMAÇÃO DA MONTAGEM DO VETOR DE DELEÇÃO pNPTS_Bla1

A confirmação da construção satisfatória do vetor de deleção, denominado pNPTS_Bla1, foi realizada por análise de restrição enzimática como consta a seguir:

- Três digestões simples: Enzima *Hind*III somente, enzima *Bam*HI somente e enzima *Eco*RI somente.
- Três digestões duplas: Enzimas *Hind*III e *Bam*HI, enzimas *Bam*HI e *Eco*RI e enzimas *Hind*III e *Eco*RI.
- Uma digestão tripla: Enzimas *Hind*III, *Bam*HI e *Eco*RI.

Em seguida, as reações de digestão e uma alíquota do vetor pNPTS_Bla1 foram submetidas a eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%) com brometo de etídeo para visualização dos tamanhos dos fragmentos obtidos.

3.9 TRANSFORMAÇÃO DE XAC POR ELETROPORAÇÃO

O vetor de deleção construído foi utilizado na eletroporação de células de XAC eletrocompetentes, a qual foi realizada em eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation Systems* (BIO-RAD) no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada (UFSCar) utilizando aproximadamente 200ng de DNA e cubetas de 2mm sob as condições 2500 V, resistência de 50 Ω e capacitância de 50 μ F (AMARAL et al., 2005).

Em seguida, foram adicionados às células 2mL de meio líquido LB, e realizada incubação por 1 hora sob agitação de 200rpm e 28 °C. Posteriormente ao período de incubação, o cultivo foi submetido à centrifugação a 10000x g, ressuspensão e plaqueamento, por 3 dias ou mais, em meio ágar-LB contendo 30 μ g/mL de canamicina.

Parâmetros diferentes também foram aplicados e combinados entre si em diversas tentativas de transformação da XAC por eletroporação, como segue:

- Substituição de meio LB por meio NYG (0,8% de caldo nutriente, 0,5% extrato de levedura, 0,1% glicose).
- Incubação em meio líquido por 15 minutos e por 2 horas.
- Plaqueamento em meio ágar-LB isento de antibióticos e em meio ágar-LB contendo sacarose.
- Eletroporação realizada sob 3000 V, resistência de 200 Ω e capacitância de 25 μ F.
- Centrifugação a 8000x g.

Experimentos controles também foram realizados, nos quais células foram eletroporadas na presença de plasmídeo pNPTS_0223 ou foram eletroporadas na ausência de plasmídeo e plaqueadas em meio isento de antibiótico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

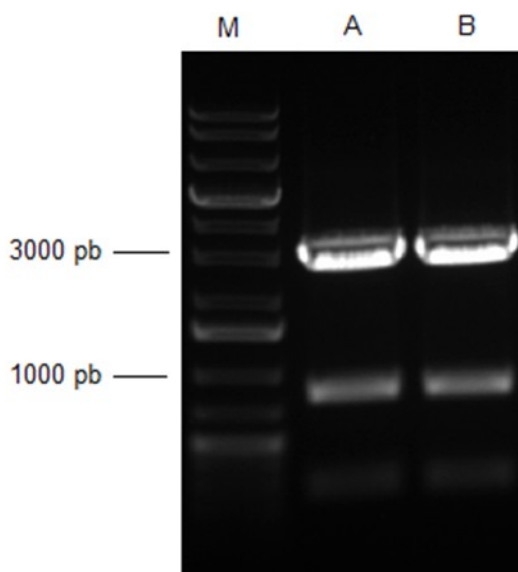
4.1 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS *UPSTREAM* E *DOWNSTREAM* À ORF XAC3162

A realização de PCR contendo os oligonucleotídeos específicos para amplificação de regiões de 1kb *upstream* e *downstream* à ORF XAC3162 e de eletroforese em gel de agarose permitiram a obtenção dos fragmentos de interesse a uma concentração de 20ng/ μ L.

Os fragmentos *upstream* e *downstream* amplificados foram clonados individualmente no vetor de propagação pJET1.2/blunt e utilizados em transformação com células *E. coli* DH5 α competentes, as quais foram plaqueadas em meio ágar-LB contendo ampicilina 50 μ g/mL. Devido à propriedade de seleção positiva do vetor utilizado, foi possível selecionar colônias transformantes e extrair seu DNA plasmidial, quantificado em aproximadamente 320ng/ μ L.

O DNA plasmidial dos transformantes foi submetido à análise de restrição enzimática em gel de agarose e como pretendido foram visualizadas duas bandas de 3000 pb, correspondentes ao vetor pJET1.2, e duas bandas de 1000 pb, correspondentes aos fragmentos de interesse. O sequenciamento dos fragmentos confirmou a correspondência entre as sequências obtidas e as pretendidas.

Figura 7 - Eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%) das reações de digestão enzimática dos vetores de propagação pJET1.2_Up e pJET1.2_Down. A análise de restrição enzimática dos vetores de propagação pJET1.2_Up e pJET1.2_Down, digeridos individualmente, apresentou, cada uma, uma banda de aproximadamente 3000 pb e uma banda de 1000 pb, as quais representam os vetores pJET1.2 clivados e os fragmentos de interesse livres, respectivamente. **M** | Padrão de tamanho molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific). **A** | Resultado da digestão enzimática do plasmídeo pJET1.2_Up com as enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI*. **B** | Resultado da digestão enzimática do plasmídeo pJET1.2_Down com as enzimas de restrição *BamHI* e *EcoRI*.

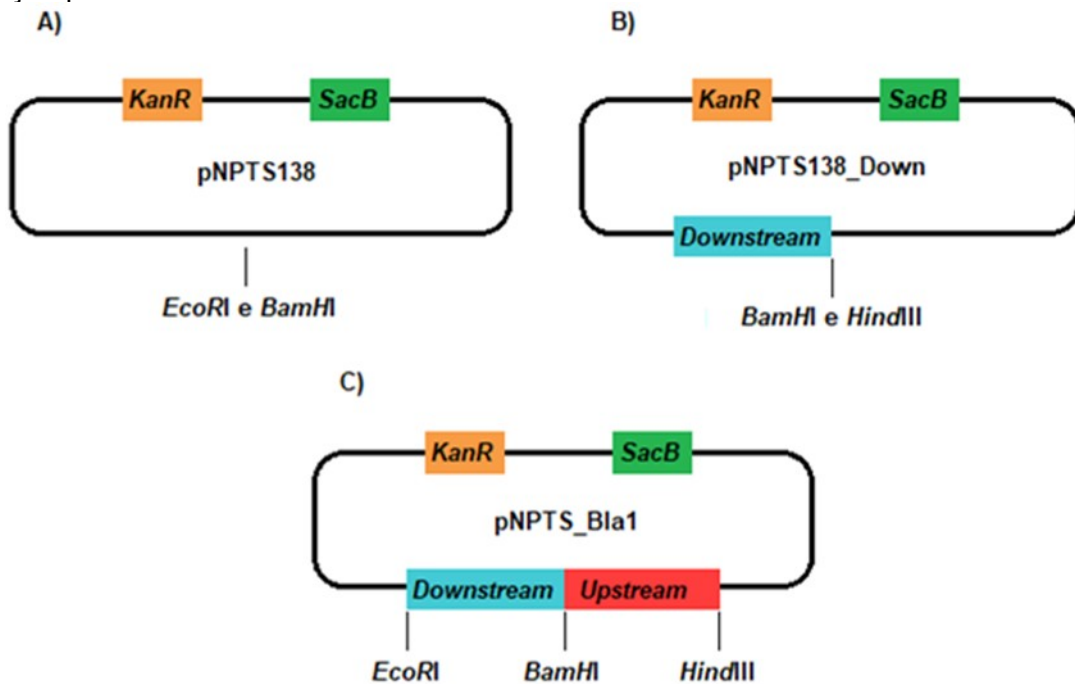


Fonte: própria autora.

4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE DELEÇÃO PNPTS138

Foi realizada a clonagem *in tandem* dos fragmentos *upstream* e *downstream* à ORF XAC3162 no vetor de deleção pNPTS138, transformação em células de *E.coli* DH5 α e seleção de células transformantes, resistentes à canamicina, para extração do novo vetor construído denominado pNPTS_Bla1 e quantificado em 440ng/ μ L.

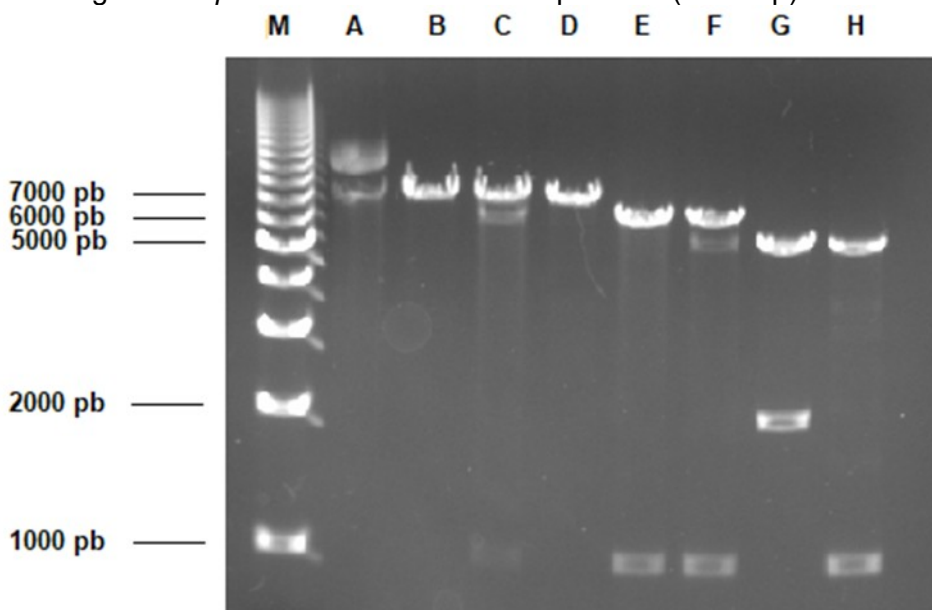
Figura 8 - Representação gráfica da construção do vetor de deleção, pNPTS_Bla1. Os fragmentos *upstream* e *downstream* à ORF XAC3162 estão representados pelas porções em vermelho e azul, respectivamente. O gene conessor da resistência à canamicina, *KanR*, está representado em laranja e o gene conessor da intolerância à sacarose, *SacB*, está representado em verde. As linhas verticais sinalizam em A) as endonucleases utilizadas na primeira abertura do vetor de deleção, em B) as endonucleases utilizadas na segunda abertura do vetor de deleção, o qual nesta etapa já apresentava fragmento *downstream* integrado, e a localização relativa dos sítios de restrição e em C), representação do vetor pNPTS_Bla1 construído, a localização relativa dos sítios de restrição para todas as endonucleases utilizadas.



Fonte: própria autora.

Para confirmação da construção do vetor de deleção, denominado pNPTS_Bla1, foi realizada por análise de restrição enzimática e eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%).

Figura 9 - Análise de restrição enzimática do vetor de deleção pNPTS_Bla1 em gel de TAE agarose (0,8%). Foram realizadas sete reações de digestão com combinações específicas das endonucleases *Hind*III, *Bam*HI e *Eco*RI para visualização do tamanho dos fragmentos resultantes e confirmação da construção do vetor pNPTS_Bla1 (7000 pb). **M** | Padrão de tamanho molecular EZ Load 1kb Molecular Ruler (Bio-Rad). **A** | Alíquota do vetor pNPTS_Bla1 não submetida à digestão (7000 pb). **B** | Clivagem com *Hind*III, resultando no vetor linearizado (7000 pb). **C** | Clivagem com *Bam*HI, resultando no vetor linearizado (7000 pb). **D** | Clivagem com *Eco*RI, resultando no vetor linearizado (7000 pb). **E** | Clivagem com *Hind*III e *Bam*HI, resultando na separação do fragmento *upstream* (1000 pb). **F** | Clivagem com *Bam*HI e *Eco*RI, resultando na separação do fragmento *downstream* (1000 pb). **G** | Clivagem com *Hind*III e *Eco*RI, resultando na separação do fragmento *upstream* e *downstream* juntos (2000 pb) **H** | Clivagem com *Bam*HI, *Hind*III e *Eco*RI, resultando na separação do fragmento *upstream* e *downstream* separados (1000 pb).



Fonte: própria autora.

4.3 TRANSFORMAÇÃO DE XAC POR ELETROPORAÇÃO

Primeiramente, foi testada a eletroporação sob 2500 V, resistência de 50 Ω e capacitância de 50 μ F (AMARAL *et al*, 2005), adição posterior de 2mL de meio LB às células, incubação por 1 hora sob agitação de 200rpm e 28 $^{\circ}$ C e centrifugação a 10000x g. Após diversas tentativas sem a obtenção de transformantes, foram realizadas mudanças no protocolo inicial e novos parâmetros foram testados e combinados entre si.

Os novos parâmetros foram escolhidos considerando-se os fatores a seguir:

- Diferentes campos elétricos causam impactos diferentes no comportamento mecânico das membranas celulares (recuperação ou ruptura) e no transporte molecular.
- Velocidade excessiva durante a centrifugação das células pode ocasionar seu rompimento.
- Tempo de regeneração celular (incubação) pós a eletroporação inadequado contribui para baixa viabilidade das células.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados nas eletroporações para transformação de XAC.

Tratamento	kV, Ω , μ F	Meio de Cultivo	Incubação (min)	Centrifugação	Kan	Sac	Plasmídeo
1	2,5 kV, 50 Ω , 50 μ F	LB	120	10.000 xg	+	-	pNPTS_Bla1
2	2,5 kV, 50 Ω , 50 μ F	LB	60	10.000 xg	+	-	pNPTS_Bla1
3	2,5 kV, 50 Ω , 50 μ F	LB	15	10.000 xg	+	-	pNPTS_Bla1
Controle 1	2,5 kV, 50 Ω , 50 μ F	LB	120	10.000 xg	+	-	pNPTS_0223
4	3 kV, 200 Ω , 25 μ F	LB	60	8.000 xg	+	-	pNPTS_Bla1
5	3 kV, 200 Ω , 25 μ F	LB	15	8.000 xg	+	-	pNPTS_Bla1
6	3 kV, 200 Ω , 25 μ F	LB	120	8.000 xg	+	-	pNPTS_Bla1
Controle 2	3 kV, 200 Ω , 25 μ F	LB	60	8.000 xg	+	-	pNPTS_0223
7	3 kV, 200 Ω , 25 μ F	NYG	60	8.000 xg	+	-	pNPTS_Bla1
8	3 kV, 200 Ω , 25 μ F	LB	60	8.000 xg	-	-	pNPTS_Bla1
9	3 kV, 200 Ω , 25 μ F	LB	60	8.000 xg	-	+	pNPTS_Bla1
10	3 kV, 200 Ω , 25 μ F	LB	60	8.000 xg	-	-	Ausente

Os procedimentos foram realizados utilizando-se de diferentes condições, descritas na Tabela 4 (tratamento 1 ao 7), e todas resultaram na ausência de transformantes. Com o objetivo de testar a eficácia dos parâmetros dos materiais utilizados, dois experimentos controle (tratamentos “controle 1” e “controle 2”) foram realizados utilizando o plasmídeo pNPTS_0223, construído no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada (UFSCar), e apresentaram transformantes resistentes à canamicina, indicação de que houve a integração do vetor de deleção ao cromossomo bacteriano.

Os tratamentos 1 ao 7 tiveram por objetivo testar diferentes tempos de incubação, velocidades de centrifugação e campos magnéticos e as combinações entre os mesmos. Os tratamentos 8, 9 e 10 foram realizados a fim de testar a hipótese de a ausência de transformantes ser relacionada à ruptura celular durante a eletroporação ou centrifugação. Nos tratamentos 8 e 10 não houve a adição de

canamicina ou sacarose e todos resultaram em colônias bacterianas, indicando sobrevivência celular e ausência da integração do plasmídeo ao cromossomo. No tratamento 9, o cultivo foi realizado na ausência de canamicina e presença de sacarose para investigar também a possibilidade de que o plasmídeo estivesse integrado ao cromossomo porém com perda da resistência a canamicina e o mesmo também apresentou colônia bacteriana.

A partir de tais resultados, há indicação de que as condições das eletroporações, assim como a velocidade das centrifugações e os diferentes tempos de incubação não foram responsáveis por acarretar inviabilidade celular ou impacto negativo na integração do plasmídeo ao cromossomo bacteriano.

5 CONCLUSÃO

A construção do vetor de propagação e a construção do vetor de deleção foram eficazes e satisfatórias.

Devido à ausência de colônias de XAC resistentes à canamicina ou sensíveis a sacarose, há grande indicativo de um ou mais fatores que impedem a incorporação do vetor de deleção construído ao cromossomo bacteriano, a qual se daria através de um primeiro evento de recombinação homóloga entre ambos, ou de um produto recombinante instável. Para elucidação de tais fatores é necessária investigação posterior.

REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, A. V.; GOTO, L. S.; NOVO-MANSUR, M. T. M. treA codifies for a trehalase with involvement in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* pathogenicity. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. e0231024, 23 mar. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0231024.

AMARAL, A. M. do et al. Transformation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by electroporation. **Fitopatologia Brasileira**, [S. l.], v. 30, p. 292-294, jun. 2005. DOI: 10.1590/S0100-41582005000300013.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, [S. l.], v. 289, n. 1036, p. 321-331, 16 maio 1980. DOI: 10.1098/rstb.1980.0049.

AUSUBEL F. M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. Green Publishing Associates and Wiley & Sons: New York, 1994.

BEDENDO, I.; AMORIM, L. Ambiente e doença: *In*: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (ed.). **Manual de fitopatologia** - princípios e conceitos. vol. 1. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 2011. p. 133-147.

BEHLAU, F.; BELASQUE JÚNIOR, J. **Cancro Cítrico: a doença e seu controle**. Araraquara: Fundecitrus, 2014. 82 p.

BEHLAU, F.; SALA, I.; BASSANEZI, R. B. **Manual de Cancro Cítrico: medidas essenciais de controle**. 4. ed. Fundecitrus, Araraquara, 2019. 51 p. ISBN: 978-85-68170-13-7. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/manual_detalhes/manual-de-cancro-citrico/79.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, p. 577-599, dez. 2008. DOI: 10.1590/S1516-93322008000400005.

BITANCOURT, A. A. O cancro cítrico. **O biológico**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 101-111, 1957.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa MAPA nº 21, de 25 de abril de 2018**. Brasília, DF, Diário Oficial da União n.º 90, p. 9-12, 11 maio 2018. ISSN 1677-7042.

CASSARO, E. G. **Clonagem da ORF XAC3162, uma β -lactamase de *Xanthomonas citri*: expressão e caracterização parcial da proteína heteróloga**. 2017. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 160-201, 2010. DOI: 10.1128/CMR.00037-09.

ERPEN, L. et al. Análise do cultivo da laranja no Estado de São Paulo de 2001 a 2015. **Revista iPecege**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 33-43, jan.-mar. 2018. DOI: 10.22167/r.ipecege.2018.1.33. ISSN: 2359-5078.

FAWCETT, H. S. **Citrus diseases and their control**. New York: McGraw-Hill, 1936. 656 p.

FAWCETT, H. S.; BITANCOURT, A. A. Occurrence, pathogenicity, and temperature relations of *Phytophthora* species on Citrus in Brazil and other South American countries. **Archivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 11, n. 15, p. 107-118, 1940.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Estimativa da safra de laranja 2022/2023 do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/ Sudoeste Mineiro**. Araraquara: Fundecitrus, 2022a. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/2022_05_26_Sumario_Executivo_da_Estimativa_da_Safra_de_Laranja_2022-2023.pdf. Acesso em: 01 nov. 2022.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Incidência de cancro cítrico aumenta 39% no Estado de São Paulo. **Fundecitrus**, Araraquara, 07 dez. 2012. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/incidencia-de-cancro-citrico-aumenta-39-no-estado-de-sao-paulo/13>. Acesso em: 11 jun. 2022.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Levantamento da incidência das doenças dos citros no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/ Sudoeste Mineiro**. Greening, CVC e Cancro Cítrico. Araraquara: Fundecitrus, 2022b. 75 p. Disponível em: https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Levantamento%20de%20doencas%202022_Relatorio%20completo.pdf. Acesso em: 01 nov. 2022.

FUNDECITRUS - FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. Safra de laranja 2022/23 do cinturão citrícola de SP e MG é estimada em 316,95 milhões de caixas. **Fundecitrus**, Araraquara, 26 maio 2022c. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/safra-de-laranja-202223-do-cinturao-citricola-de-sp-e-mg-e-estimada-em-31695-milhoes-de-caixas/1185#:~:text=A%20safra%20de%20laranja%202022,%2Dfeira%2C%2026%20de%20maio..> Acesso em: 01 ago. 2022.

GARCIA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology advances**, [S. l.], v. 18, n. 7, p. 549-579, 01 nov. 2000. DOI: 10.1016/S0734-9750(00)00050-1.

GAY, P. et al. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 164, n. 2, p. 918-921, 01 nov. 1985. DOI: 10.1128/JB.164.2.918-921.1985.

GOTO, M. Citrus canker. *In*: KUMAR, J. et al. (ed.). **Plant diseases of international importance**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1992. cap. 3, p. 170-208

GRAHAM, J. H. et al. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, [S. l.], v. 82, n. 11, p. 1319-1325, 05 ago. 1992.

GRAHAM, J. H. et al. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. **Molecular plant pathology**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1-15, 2004. DOI:10.1046/J.1364-3703.2003.00197.X.

LARANJEIRA F. F., et al. Fungos, procariotos e doenças abióticas. *In*: MATTOS JÚNIOR D. et al. (ed) **Citros**. Instituto Agrônômico FUNDAG: Campinas, 2005. p. 509-566.

LEITE JÚNIOR, R. P.; MOHAN, S. K. Integrated management of the citrus bacterial canker disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in the State of Paraná, Brazil. **Crop protection**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 3-7, fev. 1990. DOI: 10.1016/0261-2194(90)90038-9.

NAMEKATA, T. **O cancro cítrico**. São Paulo: [s. n.], 1999. 6 p.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G. **Anuário da citricultura**. São Paulo: Citrus, 2017. 55 p.

OLIVEIRA, R. P. et al. (ed.) **Porta-enxertos para citros**. 1. ed. Pelotas: Embrapa, out. 2008. 45 p. ISSN 1806-9193.

PADMANABHAN, D.; VIDHYASEKARAN, P.; RAJAGOPALAN. Changes in photosynthesis and carbohydrate content in canker and halo regions in *Xanthomonas citri* infected citrus leaves. **Indian Journal Phytopathology**, [S. l.], v. 27, p. 215-217, 1974.

RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 344-355, 11 abr. 2011.

SCHUBERT, T. S. et al. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida —again. **Plant disease**, [S. l.], v. 85, n. 4, p. 340-356, 23 abr. 2001. DOI: 10.1094/PDIS.2001.85.4.340.

SILVA, A. C. R. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, [S. l.], v. 417, n. 6887, p. 459-463, 23 maio 2002.

SOUSA, J. C. **Manual de Antibiótico Antibacterianos**. 2. ed. Porto: Fundação Fernando Pessoa, 2006. 686 p. ISBN 972-8830-49-1.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. antibióticos beta-lactâmicos. **Doenças Infecciosas e Microbiologia Clínica**, [S. l.], v. 27, n. 2 p. 116-129, fev. 2009. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.12.001.

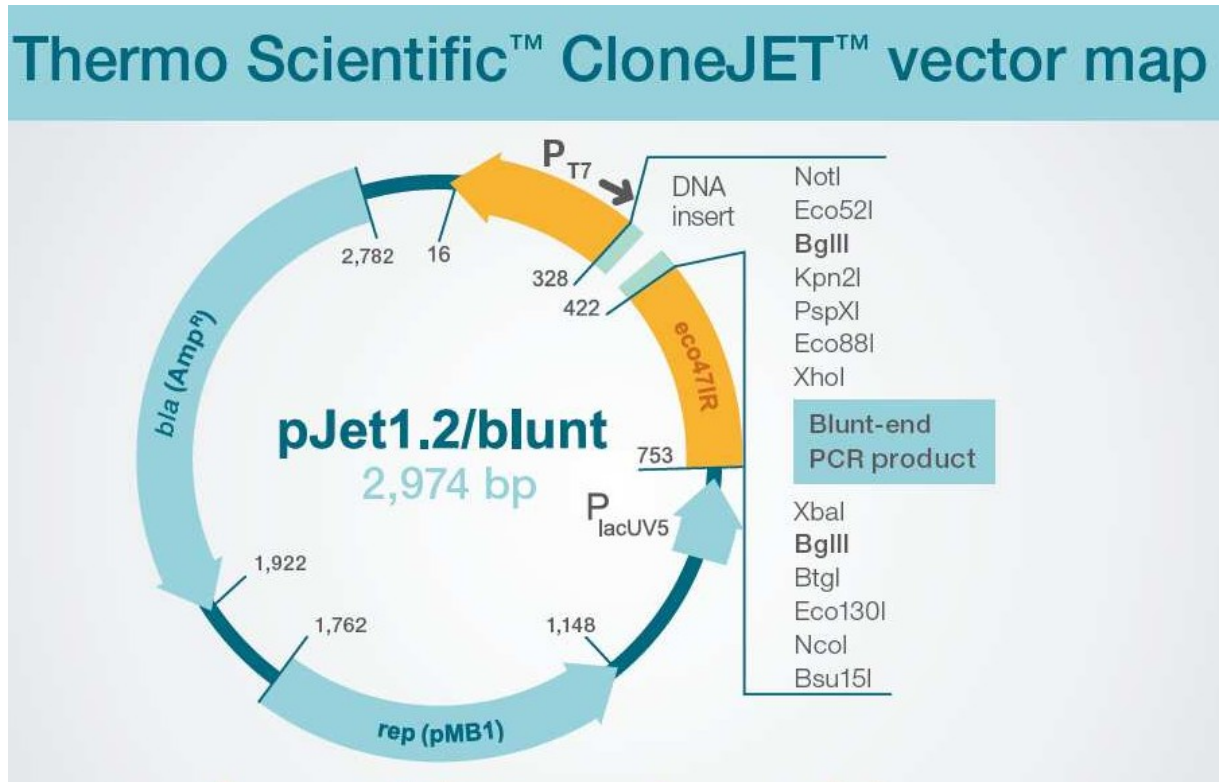
VAUTERIN, L.; YANG, P.; SWINGS, J. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 298-304, 01 jan. 1996. DOI: 10.1099/00207713-46-1-298.

WENG, S. F. et al. Identification of a novel β -lactamase produced by *Xanthomonas campestris*, a phytopathogenic bacterium. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S. l.], v. 43, n. 7, p. 1792-1797, 01 jul. 1999. DOI: 10.1128/AAC.43.7.1792.

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. S3-S7, ago. 1999. DOI: 10.1016/S0924-8579(99)00085-0.

ZEBA, B. Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance. **African journal of biotechnology**, [S. l.], v. 4, n. 13, p. 1559-1562, dez. 2005. DOI: 10.4314/ajfand.v4i13.71835. ISSN 1684-5315.

ANEXO A – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO VETOR DE PROPAGAÇÃO PJET1.2



ANEXO B – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO VETOR SUICIDA PNPTS138