

PHA sintase de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: influência na patogenicidade e produção de proteína recombinante em *Escherichia coli*

PHA synthase of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: influence in pathogenicity and production of recombinant protein in *Escherichia coli*

Julio Cesar BORTOLOSSI¹, Cristiano Barbalho FERREIRA¹, Maria Inês Tiraboschi FERRO¹, Jesus Aparecido FERRO¹, Julio Cezar Franco de OLIVEIRA²

¹ UNESP-Universidade Estadual Paulista. Departamento de Tecnologia, FCAV- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil. juliunifesp@yahoo.com.br

² Universidade Federal de São Paulo / Departamento de Ciências Biológicas-UNIFESP-Diadema, SP, Brasil.

Resumo

A enzima PHA sintase atua na síntese de poli-hidroxicanoatos, que na forma de grânulos intracelulares constituem substâncias de reserva da célula e podem, ainda, dar formação a biopolímeros. Um mutante de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) foi identificado como tendo a subunidade E da enzima PHA sintase mutada. Este mutante quando inoculado em planta cítrica hospedeira foi capaz de induzir sintomas de cancro-cítrico distinto do que normalmente é observado para a *Xac* selvagem. Através de inoculação em planta hospedeira o perfil de crescimento da *Xac* selvagem e da *Xac* mutada na enzima PHA sintase foi avaliado, comparou-se o crescimento dessas bactérias, selvagem e mutante de *Xac* ao longo da infecção. As curvas de crescimento revelaram que o mutante de *Xac* para a enzima PHA sintase cresceu menos que a *Xac* selvagem nos dois primeiros dias de infecção, contudo, a partir daí não foi encontrada diferença significativa de crescimento entre selvagem e mutante, até o período final de infecção, que foi de 14 dias. Visando a estudos estruturais da subunidade E da enzima PHA sintase da *Xac*, o gene codificador desta proteína foi clonado em vetor de expressão, e a proteína recombinante foi produzida em *Escherichia coli* na forma solúvel.

Palavras-chave adicionais: PHA sintase; proteína recombinante; mutante; *Xanthomonas citri*; interação planta-patógeno.

Abstract

The enzyme PHA synthase plays a role in the synthesis of polyhydroxyalkanoate, which in the form of intracellular granules constitute food reserve to the cell, and can still form biopolymer. A *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) mutant was identified as having mutated the E subunit of the enzyme PHA synthase enzyme. When inoculated in citrus plants this mutant induced citrus canker symptoms distinct from those normally induced by the wild *Xac*. The growth pattern of the wild *Xac* and the mutated *Xac* were evaluated during the infection process in citrus host. The mutant grows less than the wild *Xac* in the first two days of infection, and for the other 12 days after infection evaluation no differences were observed. Aiming to further structural studies of the E subunit of PHA synthase, the gene encoding this protein was cloned in an expression vector and the recombinant protein was produced in *Escherichia coli* in a soluble form.

Additional keywords: PHA synthase; recombinant protein; mutant; *Xanthomonas citri*; plant-pathogen interaction.

Introdução

O Brasil, a partir da década de 80, tornou-se o maior produtor mundial de laranjas, e até hoje detém a liderança mundial no comércio de suco de laranja, atividade que contribui significativamente para o saldo positivo da balança comercial brasileira (NEVES & LOPES, 2005).

Com uma produção de 18,2 milhões de toneladas em 27 mil estabelecimentos rurais, em cerca de 820 mil hectares no País (MOLIN &

MASCARIN, 2007), a produtividade da cultura de citros em larga escala pode chegar a atingir até 40 toneladas por hectare (DONADIO, 1988). A cultura é suscetível a um elevado número de doenças com grande potencial de destruição, dentre as quais se destacam a tristeza dos citros (que devastou pomares nas décadas de 1930 e 1940), a clorose variegada dos citros (CVC - amarelinho), causada pela *Xylella fastidiosa* (LARANJEIRA & PALAZZO, 1999), o cancro-cítrico, causado pela bactéria fitopatogênica

Gram-Negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) (NAMEKATA et al., 1996), e recentemente o greening, uma doença causada pela bactéria *Candidatus Liberibacter* spp, descoberta no Brasil em 2004 e que vem alastrando-se e causando prejuízos cada vez maiores à citricultura (BOVÉ, 2006), o que vem inspirando o estudo deste fitopatógeno que teve o seu genoma sequenciado (DUAN et al., 2009).

O cancro-cítrico pode ser encontrado em, pelo menos, 30 países, sendo endêmico em todos os produtores da Ásia e em vários outros da América do Sul (FEICHTENBERGER et al., 1997). Essa doença foi introduzida no Brasil na década de 1950, trazida do Japão em mudas de citros infectadas que entraram ilegalmente no País (HASSE, 1987). No intuito de estudar em detalhes os mecanismos utilizados pela *Xac* no processo de infecção, em 2002, o agente do cancro-cítrico teve seu genoma completamente sequenciado, revelando um total de 4.428 proteínas codificadas (DA SILVA et al., 2002). A genômica funcional tornou-se então uma poderosa ferramenta para o estudo e entendimento do patossistema citros-*Xac*, possibilitando a identificação de genes bacterianos responsáveis ou supostamente responsáveis pela adaptação e desenvolvimento do patógeno no hospedeiro vegetal.

Dentre as estratégias disponíveis para o estudo de como esses genes atuam e são responsáveis pela indução dos sintomas de cancro-cítrico e disseminação do patógeno, a mutagenese ao acaso por inserção aleatória de transposon constitui-se numa metodologia eficiente para o estudo de variações fenotípicas da patogenicidade, detectadas por alterações nos sintomas induzidos nas plantas que podem ir desde alterações mais ou menos discretas até a ausência completa dos sintomas (LAIA et al. 2009).

A existência de uma biblioteca de mutantes de *Xac* por inserção aleatória de transposon (LEVANO-GARCIA et al., 2005) possibilitou a identificação de um mutante nocau-teado para o gene que codifica a subunidade E da PHA sintase (*phaE*), cuja inoculação revelou alterações discretas nos sintomas típicos de cancro induzidos em plantas cítricas hospedeiras (LAIA et al. 2009).

Os poli-hidroxicanoatos (PHAs) são biopolímeros produzidos por inúmeras bactérias sob condições apropriadas de cultivo (PIEMOLINI et al., 2004). Fisiologicamente, são macromoléculas de reserva energética, geralmente acumulados intracelularmente, na forma de grânulos no interior das células, os quais podem representar até 80% da massa seca total das células (RODRIGUES, 2005). Sob limitação de nutrientes essenciais, como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, e na presença de sufi-

ciente fonte de carbono (PIEMOLINI et al., 2004), bactérias Gram-Negativas ou Gram-Positivas, facilmente encontradas na natureza em efluentes, solo e água do mar, são capazes de acumular PHAs (BYRON, 1987). Na biossíntese de PHAs, a principal enzima controladora é a PHA sintase (*PhaC*), a qual usa o substrato β -hidroxiacil Coenzima A para polimerização (SHEU et al., 2000). Todas as bactérias estudadas até o momento apresentam pelo menos uma PHA sintase, em alguns gêneros apresentando duas sintases, sendo ambas capazes de catalisar a formação de uma ligação éster entre os grupos hidroxila e carbonila dos substratos hidroxiacil-coenzima A (HA-CoA) (PIEMOLINI et al., 2004).

A PHA sintase pode ser classificada em 4 tipos. O tipo I e o tipo II consistem em somente um tipo de subunidade (*PhaC*), com peso molecular entre 61 e 68 kDa (REHM & STEINBÜCHEL, 1999). A PHA do tipo III é formada pelas subunidades *PhaC* e *PhaE* (SHEU et al., 2000), com peso molecular ao redor de 40 kDa (REHM, 2003) e a PHA do tipo IV (e.g. *Bacillus megaterium*), que é semelhante à da classe III, porém com a subunidade *PhaE* sendo substituída pela *PhaR*, com peso molecular em torno de 20 kDa (McCOOL & CANNON, 2001).

Neste trabalho, um mutante da subunidade *PhaE* da PHA sintase de tipo III de *Xac* foi analisado por inoculações em plantas hospedeiras suscetíveis ao cancro-cítrico, e foi produzida a proteína recombinante da *PhaE* em *E. coli*, fusionada a uma etiqueta de histidina na extremidade amino-terminal e a uma proteína de fusão denominada SUMO, que é uma pequena ubiquitina modificada, composta de aproximadamente 100 aminoácidos e que está envolvida em vários processos celulares, como regulação da transcrição, organização cromossomal, transporte nuclear, reparo no DNA e em transdução de sinais (KULIOPULOS & WALSH, 1994).

Material e Métodos

Manutenção e Cultivo de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*)

A partir de estoques a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em meio TSA (10 g de triptona, 10 g de sacarose, 1 g de Na^+ glutamato, 15 g de ágar e água destilada suficiente para 1L) contendo glicerol a 15%, o isolado selvagem 306 de *Xac* e o mutante de *Xac* foram cultivados em meio de cultura TSA. As células foram multiplicadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura sob agitação de 200 rpm, ou em placas de Petri, em estufa a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Quando se fez necessário, no caso dos mutantes, $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de canamicina foram adicionados ao meio de cultura.

Obtenção e Inoculação do Mutante da PHA sintase

O mutante do gene correspondente a ORF XAC2047 (11A4) de *Xac* foi obtido por inserção aleatória do transposon Tn5, a partir do kit EZ::Tn (Epicentre®) (LEVANO-GARCIA et al., 2005), e a identificação do gene nocauteado foi realizada por sequenciamento das bordas de inserção do “transposon” no DNA genômico (LAIA et al., 2009). O mutante 11A4 foi inoculado a 10^8 ufc mL⁻¹ nos espaços intercelulares das folhas de mudas de limoeiro-cravo por pressão com uma seringa sem agulha, em dois pontos do lado direito da folha, e a bactéria selvagem, em dois pontos do lado esquerdo da mesma folha. O desenvolvimento de sintomas foi acompanhado por três semanas e registrado em fotografias digitalizadas. Como controle, foi inoculada a bactéria *Xac* selvagem no lado esquerdo das mesmas folhas inoculadas com o mutante.

Caracterização molecular do mutante 11A4

Para a caracterização molecular do locus mutado, 10 µg da construção (pBS11A4) do fragmento genômico contendo o gene XAC2047 interrompido pelo transposon, clonado no sítio *Sac*I do sítio múltiplo de clonagem do vetor pBSKII, foram digeridos com 10 unidades de enzimas de restrição, nas seguintes combinações: *Eco*RI/*Sac*I, *Bam*HI ou *Hind*III. As digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1%, em tampão 1X TAE (SAMBROOK et al., 1989), por 2 h, a 120 V. O gel foi corado com 3 µL de brometo de etídeo 10 mg mL⁻¹ adicionado no preparo do gel e no tampão de eletroforese. A análise de restrição realizada *in silico* a partir do locus PHA da *Xac*, no programa Sequencher 4.5, foi comparada com o padrão de digestão analisada em gel de agarose, da construção sequenciada na identificação do gene nocauteado.

Curvas de crescimento

Cultivos da bactéria *Xac* selvagem e do mutante 11A4, estocados em meio TSA contendo 15% de glicerol, foram semeados em meio TSA sólido (adicionado de canamicina, no caso do mutante) e incubadas a 28 °C por dois a três dias. Após o desenvolvimento de massa bacteriana, uma quantidade suficiente de bactérias foi transferida com palitos autoclavados para tubos de 50 mL, contendo 10 mL de água milli-Q estéril, seguido de agitação em vórtex até obtenção de uma suspensão homogênea de bactérias.

Cada um dos inóculos foi padronizado para 10^3 ufc mL⁻¹ com a utilização do aparelho Biofotômetro (Eppendorf) a 600 nm, em seguida inoculados em mudas de *Citrus limonia* (limão-cravo), de modo a preencher toda a área foliar.

Para cada um dos tempos da curva de crescimento (0; 2; 6; 8; 10; 12 e 14 dias após a inoculação), foram retirados discos das folhas com 0,8 cm de diâmetro, sendo que cada disco foi transferido para um tubo de 1.500 µL, contendo 1 mL de água estéril. Utilizando uma furadeira elétrica contendo bastão macerador de plástico com ponta no formato do fundo do tubo, os discos foram macerados. Em seguida, foram procedidas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-9} para cada condição experimental. De cada uma das diluições, foram semeados 10 µL em meio TSA sólido, distribuídos de forma a se obterem 9 micro-gotas enfileiradas (método de microcolônia de ROMEIRO, 2001). Numa mesma placa, foram aplicadas todas as diluições em triplicata, sendo em seguida incubadas a 28 °C por dois dias, para se visualizarem as colônias de bactérias viáveis e então contá-las. A partir destes dados, foram obtidos gráficos de curva de crescimento *in planta*, onde o Log UFC cm⁻² compõe o eixo Y (ordenada), e os dias após inoculação a abscissa (X). As curvas de crescimento foram estimadas a partir de três experimentos independentes.

A partir das médias das três réplicas biológicas realizadas em triplicata para cada ponto, obteve-se o Desvio-Padrão utilizando a função DESVPAD do programa Excel da Microsoft. O Erro-Padrão, que expressa os erros potenciais relativos a cada marcador de dados em uma seqüência de dados, foi encontrado dividindo o Desvio-Padrão pela raiz do número de repetições de cada ponto.

Isolamento e Clonagem do Gene da subunidade E da PHA sintase em vetor de expressão

Os oligonucleotídeos *forward*2047 (5'-ATGGCAAGCAGCGGTTCCGGAC-3') e *reverse*2047 (5'-AACGGAGAATTCATGCCTGCG-3') foram sintetizados e utilizados para a amplificação e isolamento do gene, desde a metionina inicial até o códon de terminação. As reações de PCR foram realizadas com 100 ng de DNA de um clone de cosmídeo (ODH11), 10 pmoles de cada oligonucleotídeo, 1U de *Taq* DNA Polimerase Hi fidelity (Invitrogen), 200 µm de dNTPs, 50 mM de MgSO₄ e 1X tampão de *Taq* polimerase (Invitrogen), num termociclador Perkin Elmer da Applied Biosystems (PCR System 9700 Gene Amp®) e um programa com desnaturação inicial de 95 °C, por 2 min; seguidos de 35 ciclos de 95 °C, por 30 s; 50 °C, por 30 s, e 72 °C, por 2 min e 30 s. O produto de PCR correspondendo ao gene da subunidade E da PHA sintase foi clonado no vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen), resultando na construção pET-SUMO2047 para a produção da proteína fusionada a uma etiqueta de HIS-6-SUMO na porção N-terminal da proteína. Células de *E. coli*, linhagem One Shot® Mach1™.

T1R quimicamente competentes (Invitrogen), foram transformadas, e colônias isoladas foram utilizadas para minipreparação de DNA plasmidial conforme SAMBROOK et al.(1989). A partir destas preparações de DNA, os clones de interesse foram sequenciados. As reações de sequenciamento constaram de 4,0 µL de água bidestilada estéril, 3,0 µL de tampão de sequenciamento, 1,0 µL de BigDye v3, 1,0 µL de DNA plasmidial (~100 ng) e 1,0 µL do oligonucleotídeo iniciador SUMO *forward* (5'-AGATTCTTGACGACGGTATTAG-3') (Invitrogen) ou do oligonucleotídeo iniciador T7 *reverse* (5-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3') (Invitrogen).

As reações de sequenciamento seguiram os seguintes ciclos de amplificação; 96 °C por 10 s, 52 °C por 5 s e 60 °C por 4 s, repetindo esses ciclos por 35 vezes. Ao término dos ciclos, as amostras foram mantidas a 4 °C até o uso. A lavagem das reações de sequenciamento deu-se em seguida, adicionando 80 µL de isopropanol a 75% a cada amostra. Após 15 min à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g em centrífuga de placas Rotanta 46R (Hettich), por 30 min, a 22 °C. Após precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado, e as amostras foram lavadas duas vezes, com 200 µL de etanol a 70%, seguido de centrifugação a 10.000 x g, por 15 min, a 20 °C. As amostras foram secas em bomba de vácuo por 5 minutos e submetidas ao sequenciamento em um sequenciador automático ABI 3700, conforme metodologia sugerida pelo fabricante do equipamento (Applied Biosystems). Os cromatogramas foram analisados por meio do programa Bioedit v.7.0.5., e aqueles que tiveram bom rendimento foram submetidos a análise de montagem para a verificação das ORFs no programa Sequencher 4.5. O clone que se ligou na orientação correta e não sofreu nenhuma mutação foi utilizado para transformação de células de *E. coli* linhagem BL21(DE3) (Invitrogen). Clones isolados foram analisados para a expressão da proteína heteróloga em pequena escala.

Expressão e Purificação de Proteína Recombinante

A partir da construção de expressão, um clone de *E. coli* produtor da PHA recombinante da *Xac* foi utilizado para se analisar a solubilidade da proteína. Através da análise em gel de SDS-PAGE, foi demonstrado que a proteína HIS6-SUMO-PhaE sintase havia sido produzida em grande quantidade e na forma solúvel. Este clone foi, portanto, utilizado para a produção em larga escala da proteína PhaE sintase fusionada à etiqueta HIS-6/SUMO. Para isto, o clone produtor foi inoculado em 50 mL de meio LB (1% de NaCl, 1% de triptona e 0,5% de extrato de levedura) contendo 30 µg mL⁻¹

¹ de canamicina, e incubado durante 8 h a 37 °C com agitação a 250 rpm. Posteriormente, 10 mL foram transferidos para 4 frascos contendo 1 L de meio LB (4 x 1L) e incubados nas mesmas condições até atingir uma D.O._{600nm} de 0,8, quando o indutor IPTG (isopropiltio- α -D-galactosídeo) foi adicionado a uma concentração final de 0,4 mM, e as culturas foram incubadas nas mesmas condições por mais 4 h. As células induzidas foram coletadas, ressuspensas em 40 mL L⁻¹ de tampão de lise (500 mM NaCl, 30 mM imidazol, 50 mM Tris-HCl, pH 9,0, contendo 5 mM de benzamidina e 1 mM de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) e lisadas através de sonicação (5 minutos, ciclos alternados de 9 segundos de lise e espera). Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 30.000 x g durante 30 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante, filtrado em membrana Millipore 0,45 µm. As amostras foram aplicadas em uma coluna de cromatografia de afinidade HisTrap Chelating de 5mL (Amersham), acoplada ao sistema de purificação de proteínas Akta Prime (Amersham).

Resultados

Fenótipo Mutante

Para a confirmação do fenótipo do mutante 11A4 do gene da subunidade E da PHA, culturas das bactérias selvagem e mutante foram inoculadas em plantas cítricas. Na Figura 1 verifica-se que o mutante induziu menor hiperplasia e maior necrose no tecido vegetal infectado quando comparado com o fenótipo induzido pela *Xac* selvagem, 5 dias após inoculação.



Figura 1 - Sintomas induzidos pelo mutante 11A4 da PHA de *Xac* e pela *Xac* 306 selvagem em *Citrus limonia*. Aos cinco dias após inoculação, podem-se observar diferenças entre os sintomas. O mutante 11A4 inoculado do lado esquerdo da folha, e a *Xac* 306 selvagem, do lado direito. *Symptoms induced by the mutant 11A4 of the PHA of *Xac* and by the wild *Xac* 306 in *Citrus limonia*. The mutant 11A4 was inoculated in the left side of the leaf and *Xac* 306 wild, on the right.*

Caracterização molecular do mutante 11A4

A confirmação do nocaute no gene foi realizada por digestão da construção sequenciada. O perfil da eletroforese em gel de agarose das digestões da construção pBS11A4 com *EcoRI/SacI*, *BamHI* ou *HindIII* está apresentado na Figura 2. Como observado, ocorreu a liberação do vetor pBSKII de 2,9 kb e do inserto genômico correspondendo ao locus XAC2047 contendo o transposon, de 4,2 kb. Na digestão *BamHI*, verifica-se que os insertos liberados são de 3,8 kb e de 3,3 kb. A digestão com *EcoRI* lineariza a construção de aproximadamente 7,2 kb. O padrão de digestões verificado para a construção pBS11A4 concorda com o padrão predito pela digestão *in silico* do locus contendo o gene XAC2047 com as mesmas enzimas, validando a mutação.

Curvas de crescimento *in planta*

Curvas de crescimento em plantas cítricas hospedeiras mostram (Figura 3) que as diferenças de crescimento entre *Xac* selvagem e *Xac* mutante são observadas nos dois primeiros dias de infecção, com os mutantes crescendo cerca de 10 vezes menos do que o selvagem. Nos outros doze dias de experimento, tanto o mutante quanto o selvagem cresceram na mesma proporção, mantendo a diferença evidenciada aos 2 dias do experimento. dias de infecção, com os mutantes crescendo cerca de 10 vezes menos que o selvagem.

Produção de PHA sintase recombinante

Um clone de *E. coli* expressando a subunidade E da proteína PHA sintase de *Xac* foi utilizado para se analisar a solubilidade da proteína recombinante expressa. Em análise de SDS-PAGE, foi demonstrado que a proteína HIS6-SUMO-PHA sintase foi produzida em grande quantidade e na forma solúvel. Portanto, esse clone foi utilizado para a produção e purificação da proteína recombinante em larga escala, em coluna de Níquel. O perfil eletroforético é mostrado na Figura 4 e para as frações obtidas durante a cromatografia. Como pode ser observado, a proteína de interesse estava contaminada com outras proteínas e, para aumentar a pureza, as frações contendo a proteína HIS6-SUMO-PHA sintase foram dialisadas contra 50 mM Tris-HCl, pH 9,0, contendo 500 mM NaCl e 30 mM imidazol, e repurificada na mesma coluna, o que permitiu obter a proteína com maior pureza. Foi obtida uma grande quantidade de proteína purificada ao final das duas cromatografias. As frações contendo a proteína foram reunidas e dialisadas a 25 °C em tampão 20 mM de Tris-HCl,

pH 9,0 contendo 150 mM de NaCl, com três trocas de tampão. Em seguida, o dialisado foi concentrado com Polietileno Glicol (PEG) 400, reduzindo 5X o volume concentrado de proteína, seguido de centrifugação a 10.000 x g para remover impurezas precipitadas, presentes na solução e, finalmente, dialisado quatro vezes em tampão 10 mM de Tris-HCl pH 9,0 contendo 25 mM de Glicina, até a concentração final de 5 mg mL⁻¹.

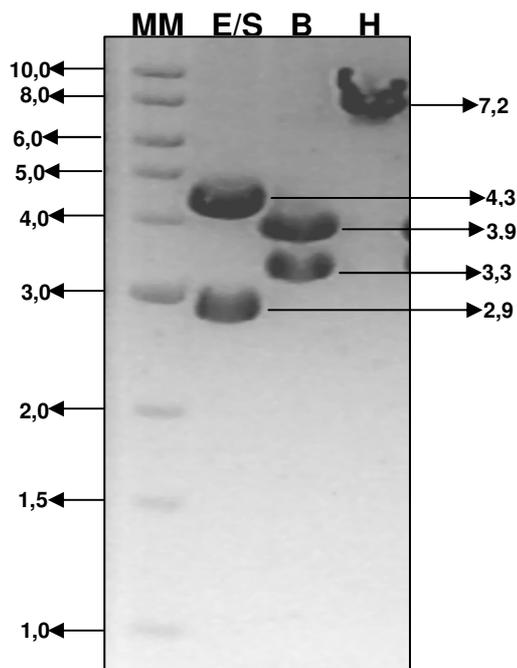


Figura 2 - Perfil eletroforético da digestão da construção pBS11A4 contendo o DNA do locus mutado. Gel de agarose a 1 % onde à esquerda foi aplicado o marcador molecular 1Kb Biolabs. As digestões com enzimas de restrição foram aplicadas no gel, na seguinte ordem: E/S (*EcoRI/SacI*), B (*BamHI*) e H (*HindIII*). O tamanho dos fragmentos separados no gel (em kb) está indicado por setas à direita na figura. *Eletctophoretic profile of the digestion of the pBS11A4 construction with the DNA of the mutated locus.* Agarose gel at 1% on whose left side the molecular marker 1Kb Biolabs was applied. The digestions with restriction enzymes were applied to the gel in the following order: E/S (*EcoR/SacI*), B (*BamHI*) and H (*HindIII*). The sizes of the fragments separated in the gel (in kb) are indicated by arrows on the right side of the figure.

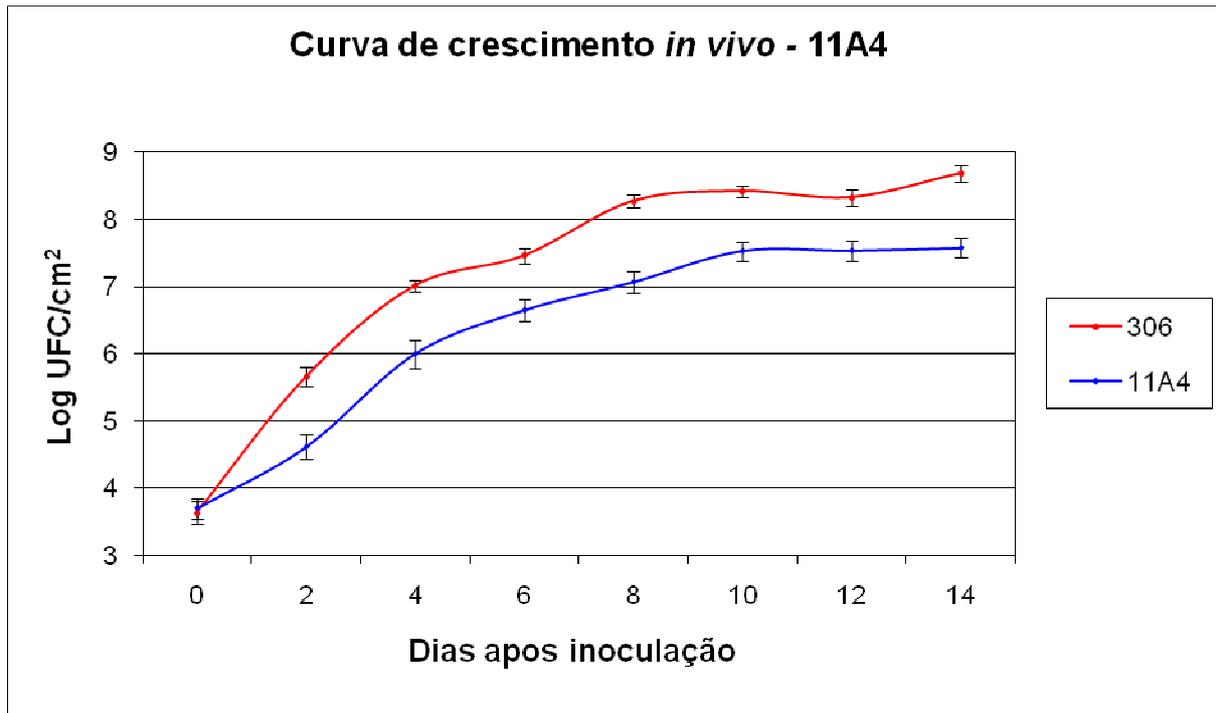


Figura 3 - Curva de crescimento *in planta*. Curva de crescimento bacteriano *in planta* a partir de inóculo a 10^3 ufc mL⁻¹. **Growth curve *in planta*.** Bacterial growth curve *in planta* starting from the inoculum at 10^3 ufc mL⁻¹.

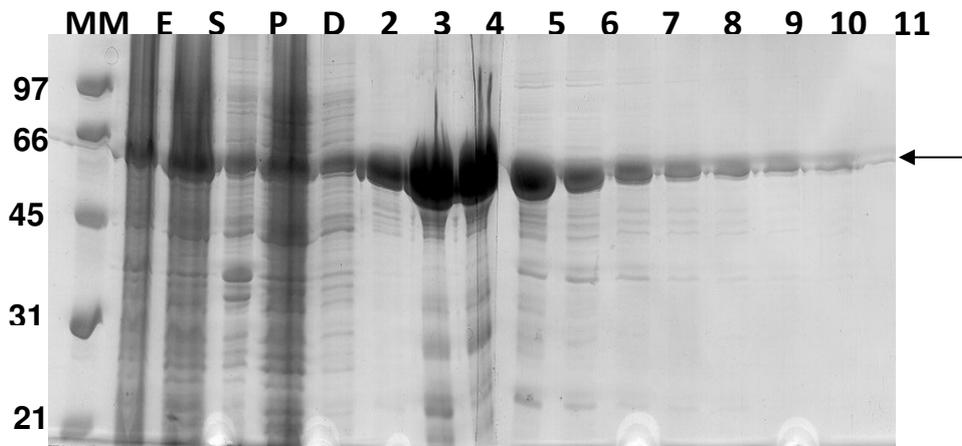


Figura 4 - Eletroforese SDS-PAGE. Proteína PHA sintase (subunidade E) recombinante em gel de poliacrilamida (12%), visualizada por Coomassie Blue. A Proteína foi produzida com Tag de His6/SUMO no N-terminal. MM (Marcador Molecular em kDa); E (Extrato Bruto); S (sobrenadante); P (precipitado); D (Descarte coluna); 2 ao 13 (tubos de cromatografia). A seta indica a proteína recombinante (~57kDa). **Recombinant PHA protein synthase (subunit E) in polyacrilamide gel (12%) visualized by Coomassie Blue.** The protein was produced with His6/SUMO tag on N-terminal. MM (Molecular Marker in kDa), E (Net Extract), S (supermatant), P (precipitate), D (Discard column), 2 to 13 (Chromatography tubes). The arrow indicates the recombinant protein (~57 kDa.)

Discussão

Uma biblioteca de mutantes de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* - *Xac* (LEVANO-GARCIA et al., 2005) foi analisada por inoculação em plantas cítricas hospedeiras, e um mutante (11A4) com alteração de sintomas de cancro induzidos em plantas foi isolado, e a identificação por sequenciamento do gene mu-

tado revelou tratar-se da subunidade E da PHA sintase de tipo III de *Xac* (LAIA et al., 2009).

O fenótipo dos sintomas induzidos pelo mutante 11A4 foi confirmado por inoculação em plantas de *Citrus limonia*, em comparação com os sintomas da *Xac* selvagem. O fenótipo de sintomas de cancro induzidos pelo mutante 11A4 foi igual ao anteriormente observado durante a

análise do banco de mutantes, confirmando a estabilidade dos sintomas verificados. O mutante 11A4 induziu menos hiperplasia que a bactéria selvagem nos primeiros 5 dias da infecção, além de induzir uma clorose pronunciada em 5 dias de infecção, que para a bactéria selvagem é visualizada, em geral, a partir do sétimo dia de infecção, dando início à fase necrótica da doença (BERGAMIN FILHO & AMORIM, 1999).

Com o intuito de se confirmar que o gene havia sido nocauteado (LAIA et al., 2009), foi realizada a digestão da construção sequenciada, que contém o fragmento genômico do mutante 11A4 interrompido pelo transposon utilizado na mutagênese. Validado o mapeamento da inserção do transposon no gene da subunidade E da PHA sintase de *Xac*, procedeu-se então a uma análise quantitativa do desenvolvimento de *Xac* mutante e selvagem *in vivo*.

Como a análise de sintomas e o registro fotográfico dos mesmos corresponde a uma análise qualitativa, foram realizadas curvas de crescimento *in planta* para o mutante da *Xac* 11A4 e para a *Xac* 306 selvagem. O mutante desenvolveu-se cerca de 10 vezes menos que a *Xac* selvagem apenas nos dois primeiros dias de infecção, depois tanto o mutante quanto a *Xac* selvagem apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento. Como a PHA sintase atua na síntese de grânulos de PHA que podem ser mobilizados como fonte de reserva da célula (PÖTTER et al., 2005), pode-se supor que, no mutante 11A4, com o nocaute da expressão da proteína PHA sintase não há acúmulo de fontes de reserva na forma de grânulos de PHA. A ausência desta fonte de reserva faz com que os mutantes cresçam menos que a selvagem durante os dois dias iniciais da infecção.

A atividade da PHA sintase tipo III requer a expressão de ambas as subunidades PhaE e PhaC. A proteína PhaE sozinha mostrou-se completamente inativa, e a PhaC isolada teve uma atividade insignificante (LIEBERGESELL et al., 1994; MÜH et al., 1999; JIA et al., 2000; HAI et al., 2001). Até onde se sabe, esta é a primeira descrição de uma correlação entre a atividade da PHA sintase e a capacidade de desenvolvimento da *Xac* na planta hospedeira. E, ainda, por se tratar de uma proteína de interesse na produção de biopolímeros (PIEMOLINI et al., 2004), a subunidade E de PHA sintase de *Xac* foi expressa em *E. coli*, em fusão com os domínios HIS-6/SUMO, na forma solúvel, visando à obtenção de cristais para estudos estruturais futuros.

Referências

BERGAMIN FILHO A.; AMORIM L. Manejo integrado de pragas (IPM): problemas conceituais para sua aplicação em fitopatologia.

Fitopatologia Brasileira, v. 24, n.3, p. 385-390, 1.999.

BOVÉ, J. M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v.88, n.1, p.7-37, 2.006.

BYRON D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.5, n.9, p. 246-250, 1.987.

DA SILVA A. C.; FERRO J. A.; REINACH F. C.; FARAH C. S.; FURLAN L. R.; QUAGGIO R. B.; MONTEIRO-VITORELLO C. B.; VAN SLUYS M. A. et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, Londres, v. 417, n.6887, p.459-463, 2002.

DONADIO L. C. Produtividade dos citros em Israel. In: DONADIO L.C. (Ed.), **Produtividade de citros**, Jaboticabal. FUNEP, 1988 p. 47-62.

DUAN Y.; ZHOU L.; HALL D. G.; LI W.; DODDAPANENI H.; LIN H.; LIU L.; VAHLING C. M.; GABRIEL D. W.; WILLIAMS K. P.; DICKERMAN A.; GOTTWALDT T. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium "Candidatus Liberibacter asiaticus" obtained through metagenomics. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.22, n.8, p.1011-20, 2.009.

FEICHTENBERGER E.; MÜLLER G. W.; GUIRADO N. Doenças dos citros. In: KIMATI H., AMORIM L., BERGAMIN FILHO A., CARMARGO L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**, 3.ed. São Paulo: Ed. Livrocere, 1.997, v.2, p. 257-296.

HAI T.; HEIN S.; STEINBÜCHEL A. Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. strain MA19. **Microbiology**, Spencers Wood, v.147, n.11, p. 3.047-3.060, 2.001.

HASSE G. A. **Laranja no Brasil 1500-1987**. São Paulo. Duprat & lobe Propaganda e Comunicação, 1987. 296p.

JIA J.; KAPPOCK J.; FRICK T.; SINSKEY A. J.; STUBBE J. Lipase provides a new mechanistic model for polyhydroxybutyrate synthases: Characterization of the functional residues in *Chromatium vinosum* PHB synthase. **Biochemistry**, Washington, v.39, n.14, p.3.927-3.936, 2.000.

- KULIOPULOS, A.; WALSH, C. T. Production, Purification, and Cleavage of Tandem Repeats of Recombinant Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v.116, n.11, p. 4.599-4.607, 1.994.
- LAIA M. L.; MOREIRA L. M.; DEZAJACOMO J.; BRIGATI J. B.; FERREIRA C. B.; FERRO M. I. T.; SILVA A. C. R.; FERRO J. A.; DE OLIVEIRA J. C. F. New genes of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* involved in pathogenesis and adaptation revealed by a transposon-based mutant library. **BMC Microbiology**, Londres, v.9, n.12, p. 1-17, 2.009.
- LARANJEIRA, F. F.; PALAZZO, D. A. Danos qualitativos a produção de laranja 'Natal' causados pela clorose variegada dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v.20, n.1, p.77-91, 1999.
- LEVANO-GARCIA J.; VERJOVSKI-ALMEDIA S.; DA SILVA A. C. R. Mapping transposon insertion sites by touchdown PCR and hybrid degenerate primers. **BioTechniques**, Nova Iorque, v.38, n.2, p.225-229, 2.005.
- LIEBERGESELL M.; SONOMOTO K.; MADKOUR M.; MAYER F.; STEINBÜCHEL A. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.226, n.1, p. 71-80, 1.994.
- MCCOOL G. J.; CANNON M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.183, n.14, p.4.235-4.243, 2.001.
- MOLIN, J. P.; MASCARIN, L. S. Colheita de citros e obtenção de dados para mapeamento da produtividade. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.259-266, 2.007.
- MÜH U.; SINSKEY A. J.; KIRBY D. P.; LANE W. S.; STUBBE J. A. PHA synthase from *Chromatium vinosum*: Cysteine 149 is involved in covalent catalysis. **Biochemistry**, Washington, v.38, n.2, p.826-837, 1.999
- NAMEKATA T.; ROSSI A. C.; CERAVOLO L. C. Avaliação de novos métodos de erradicação de cancro cítrico. **Laranja**, Cordeirópolis, v.17, n.1, p.67-78, 1.996.
- NEVES M. F.; LOPES F. F. **Caminhos para a Citricultura**: uma agenda para manter a liderança mundial. São Paulo: Editora Atlas, 2005. 225p.
- PIEMOLINI L. T.; RÖSSLE S. C.; BISCH P. M.; ANTÔNIO R. V.; PORTO L. M. Mutações específicas de PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* a partir da modelagem estrutural da proteína. In: COBEQ, 15., 2004, Curitiba. **Anais....Curitiba**, 2004.
- PÖTTER M.; MÜLLER H.; STEINBÜCHEL A. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, Spencers Wood, v.151, n.3, p.825-833, 2005.
- REHM B. H. A.; STEINBÜCHEL A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Cambridge, v.25, n.1, p.3-19, 1999.
- REHM B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemical Journal**, Londres, v.376, p.15-33, 2003.
- ROMEIRO R. S. In: **Métodos de Bacteriologia de Plantas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 2001, 279p.
- RODRIGUES R. C. **Condições de cultura para a produção de poli(3-Hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimento**. 2005. 90f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.
- SAMBROOK J.; FRITCH E. F.; MANIATS T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Press, 1989.
- SHEU D. S.; WANG Y. T.; LEE C. Y. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. **Microbiology**, Spencers Wood, v.146, n.8, p.2.019-2.025, 2000.