

Construção de vetores para obtenção de mutantes de *X. fastidiosa* por recombinação homóloga

Gabriela M. **CARRER**¹; Alessandra A. de **SOUZA**².

Nº 0900017

Resumo

A partir das informações geradas com o sequenciamento da *Xylella fastidiosa*, agente causal da clorose variegada dos citros, têm aumentado os estudos sobre a função dos genes putativamente identificados. A estratégia para estudo de genoma funcional inclui abordagens que objetivam uma cobertura do genoma e a confirmação particular de cada gene. Um dos aspectos abordados no genoma funcional da *X. fastidiosa* tem sido a expressão de genes associados à patogenicidade da bactéria, baseados na hipótese de que esse processo está associado à formação do biofilme, condição essencial para a bactéria se estabelecer e colonizar o xilema, conduzindo, em consequência, à doença. Análise da expressão diferencial de genes da *X. fastidiosa* em fase mais patogênica (Souza et al., 2003) e durante a formação do biofilme (Souza et al., 2004) revelou genes possivelmente ligados à patogenicidade seja com papel na adesão da bactéria ao xilema do hospedeiro, ou a capacidade de adaptação as condições ambientais dentro do hospedeiro. A proposta deste projeto é construir vetores que possam ser utilizados para obtenção de mutantes para os genes *fimA*, *hsf*, *msrA*, *acrA*, *cvaC* e *xpsE* (previamente encontrados como associados a patogenicidade) de *X. fastidiosa* e posteriormente avaliar o papel biológico destes genes na patogenicidade desta bactéria.

Abstract

From the information generated with sequencing of *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus variegated chlorosis, has increased the studies on the role of putative genes identified. The strategy for study of functional genomics approaches that aim to include

¹Bolsista PIBIC/CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, Centro Universitário Herminio Ometto, ✉ gabycarrer@yahoo.com.br

²Orientador: Pesquisadora, Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC, ✉ alessandra@centrodecitricultura.br

coverage of the genome and confirmation of each particular gene. One of the aspects addressed in the functional genome of *X. fastidiosa* has been the expression of genes associated with pathogenicity of the bacteria, based on the assumption that this process is associated with the formation of biofilms, an essential condition for the bacteria to establish and colonize the xylem, leading, in consequence, to the disease. Analysis of differential expression of genes of *X. fastidiosa* being more pathogenic (Souza et al., 2003) and during the formation of biofilms (Souza et al., 2004) revealed genes possibly connected either with the pathogenic role in adherence of bacteria to the host xylem, or the ability to adapt environmental conditions within the host. The purpose of this project is to construct vectors that can be used to obtain mutants for the genes *fimA*, *hsf*, *msrA*, *acrA*, *cvaC* and *xpsE* (previously found to be associated with pathogenicity) from *X. fastidiosa* and then evaluate the biological role of these genes in pathogenic bacteria.

1-Introdução

Dentre as doenças que ameaçam a citricultura brasileira destaca-se a clorose variegada dos citros (CVC), causada pela bactéria *Xylella fastidiosa*, é uma das mais preocupantes, afetando todas as variedades de laranjas doce em todos os Estados produtores de citros do Brasil.

X. fastidiosa é limitada ao xilema das plantas hospedeiras e ao lúmen do canal alimentar de insetos vetores (cigarrinha), responsáveis pela transmissão da bactéria entre as plantas (Hopkins, 1995).

Os principais sintomas da CVC decorrentes da colonização da *X. fastidiosa* em plantas de laranja doce caracteriza-se pelo aparecimento de manchas cloróticas na parte dorsal das folhas correspondendo a pontos marrons com aspecto de goma na superfície ventral, as plantas infectadas apresentam um aspecto de debilidade geral, os sintomas sugerem haver um entupimento no xilema ocasionando principalmente o bloqueio do transporte de água e nutrientes, resultando uma eficiente capacidade de aderência e multiplicação da *X. fastidiosa* nestes vasos condutores caracterizado pela formação do biofilme (Machado et al., 1994; McElrone et al., 2001; Machado et al., 2001a; Medina, 2002).

Com o sequenciamento completo do DNA da linhagem 9a5c causadora da CVC, novos estudos comparativos do genoma funcional destes fitopatógenos foram iniciados. A recombinação homóloga é um tipo de transformação utilizado para o estudo do genoma funcional. Essa transformação é utilizada em *X. fastidiosa* através do uso de plasmídeos replicativos ligados aos genes *fimA*, *hsf*, *msrA*, *acrA*, *cvaC* e *xpsE* previamente estudados através de microarranjos de DNA, pelo grupo de pesquisa (De Souza et al., 2003).

A mutagênese por recombinação homóloga em *X. fastidiosa* causadora da CVC tem se mostrado muito difícil devido a isso, o desenvolvimento de um banco de mutantes da linhagem de citros por diferentes técnicas de transformação abre novas portas para o estudo do genoma funcional deste fitopatógeno.

2-Material e métodos

2.1-Cultivo das bactérias

O isolamento foi feito com plantas sintomáticas, mantidas em casa de vegetação, das diferentes linhagens de *X. fastidiosa* 9a5c e 11399 por meio de desinfestação e plaqueadas em meio PW, incubadas a 28°C por 20 dias até o surgimento de colônias. A linhagem J1a12 foi recuperada de um banco de culturas de diferentes linhagens de *X. fastidiosa* mantidas no -80°C. A linhagem *Escherichia coli* DH5α foi utilizada para todo o procedimento de construção e clonagem.

2.2-Construção dos vetores para obtenção de mutantes de *X. fastidiosa*

Dos genes detectados por Souza et al., (2003, 2004) associados à patogenicidade, virulência e adaptação da bactéria no hospedeiro, foram escolhidos os genes: *fimA*, *hsf*, *msrA*, *acrA*, *cvaC* e *xpsE*. Fragmentos destes genes foram amplificados por PCR através de primers desenhados para cada gene e clonados no vetor pGEM-T, posteriormente ligado ao plasmídeo com a enzima ligase e transformado em *Escherichia coli* DH5α da seguinte maneira: uma alíquota de 10μL do vetor foi adicionado em 50μL da bactéria e incubado por 1 hora no gelo. Após esse período, a mistura foi incubada por 90 segundos à 42°C e transferida rapidamente para o gelo. Adicionou-se 800μL de meio SOC e manteve-se sob agitação à 37°C por 1 hora. Após esse período, a amostra foi plaqueada em meio LB, adicionado 8μL IPTG (concentração 20mg/ml) e 40μL Xgal (concentração 24mg/ml), suprido de ampicilina (100μg/μL) e incubada overnight à 37°C. As colônias que apresentaram coloração

branca foram inoculadas em meio líquido para aumentar sua densidade celular para extração do plasmídeo.

Posteriormente, o plasmídeo foi extraído em grande escala em placa, adicionando 25µL de água autoclavada e vortexado por 20 segundos, adicionando em seguida 70µL de solução lise (STET-Tween 20) e vortexado por mais 1 minuto. Em seguida, mantido em temperatura ambiente por 5 minutos e aquecido em forno de microondas por 30 segundos. Adicionando 400µL de água, vortexado e incubado no gelo por 15 minutos. Após isso, centrifugado por 45 minutos à 300 rpm e transferido 50µL para uma nova placa, mantendo a mesma temperatura à -20°C .

O plasmídeo foi linearizado através da digestão com a enzima de restrição *Sa*II, defosforilado com a enzima fosfatase alcalina e seguido de purificação utilizando o sistema GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences).

Os genes foram ligados ao plasmídeo pUCBM21oriC (cedido pela Profa. Marilis Marques USP-São Paulo) utilizando a enzima ligase e mantido por 16 horas à 16°C, seguidos de transformação em *E. coli*. Os clones transformados foram confirmados por PCR utilizando primers específicos para cada gene; confirmadas as inserções, os clones positivos tiveram seus plasmídeos extraídos em grande escala em microplacas de filtro (Millipore), armazenados no -20°C e posteriormente utilizados na transformação de *X. fastidiosa* por eletroporação.

A inserção deste plasmídeo no genoma da bactéria, através de recombinação homóloga, leva ao rompimento do gene, produzindo assim o mutante. As condições para eletroporação foram de 1.8 kv, 400 Ω e 25µF (Monteiro et al., 2001), adaptado por nosso grupo. Após a eletroporação as bactérias foram plaqueadas em meio PW contendo ampicilina. As placas foram mantidas a 28°C até o crescimento de colônias de células transformadas.

2.3-Validação dos clones mutantes

Para certificação da recombinação homóloga foram feitas PCR de colônias, utilizando primers que anelam no plasmídeo e no genoma da bactéria, obtendo-se assim um amplicom indicativo de recombinação.

Outro teste utilizado foi o Sourthen Blot. As colônias dos possíveis transformantes foram crescidas em meio PWG líquido para extração do seu DNA genômico. Alíquotas

dos DNA foram digeridas com a enzima de restrição *EcoRI*. Como sonda, foi utilizado o fragmento corresponde ao gene estudado, gerado por PCR, marcado com digoxigenina (Dig DNA labeling Kit- Roche). O DNA digerido dos diferentes transformantes foram aplicados em gel de agarose 1% e feita uma corrida eletroforética por 6 horas à 80 volts. Após isso, foi feita a transferência do DNA para uma membrana de nylon Hybond-N (Amersham) e fixadas em alta temperatura (80°C). A membrana foi colocada em solução padrão de hibridização à 65°C por 3 horas (pré-hibridização), a sonda foi desnaturada à 95°C por 20 minutos e utilizada para incubar a membrana *overnight* à 65°C (hibridização). No dia seguinte, a membrana foi lavada 2 vezes por 5 minutos em solução 2xSSC/0,1% SDS em temperatura ambiente e 2 vezes por 15 minutos em 0,1% SSC/0,1% SDS. Enxaguada por 5 minutos em Washing Buffer e incubada por 30 minutos em 100mL de Buffer 2 temperatura ambiente. A membrana foi incubada por 40 minutos em 50mL da solução anticorpo, lavada 2 vezes com 100mL de Washing Buffer por 15 minutos e equilibrada por 5 minutos em 20mL de Buffer 3. Após isso, incubada novamente por 5 minutos em 10mL da solução CSPD em temperatura ambiente. Depois de secas, as membranas foram expostas a filme radiográfico (Kodak) por 1 hora à 37°C e revelada em sala escura para detecção do sinal.

3-Resultados e Discussão

Os genes de interesse *fimA*, *hsf*, *msrA*, *acrA*, *cvaC* e *xpsE* foram amplificados por PCR através de primers específicos e posteriormente clonados no vetor pGEM-T. O vetor foi extraído e posteriormente linearizado através da digestão com a enzima de restrição *Sall*, purificado (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit- Amersham Biociences) e ligado no vetor pUCBM21oriC utilizando a enzima T4 DNA ligase, seguido de transformação em *E.coli*.

Todos os clones obtidos foram confirmados por PCR, após a confirmação os plasmídeos foram extraídos e quantificados por gel de eletroforese utilizando o DNA fago lambda para comparação onde apresentou uma banda.

Todas as construções foram eletroporadas em *Xylella fastidiosa* linhagem 9a5c, 11399 e J1a12, utilizando a condição já citada nos materiais e métodos e plaqueadas em meio PW acrescido de ampicilina, mantidas a 28°C para crescimento de colônias de células transformantes.

Após 30 dias de incubação somente a linhagem 11399 eletroporada com a construção *acrA*+puCBM21oriC apresentou crescimento de 11 colônias.

Fêz-se a extração do DNA genômico, PCR utilizando primers específicos para confirmação da recombinação homóloga sendo observado o amplicom de 1.064pb em apenas 2 colônias, indicando uma possível recombinação.

Para o Sourthen Blot foi feito a digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *EcoRI*, transferido para membrana e hibridizada, mas não foi possível obter resultados satisfatórios.

Foram feitas novas transformações em *Xylella fastidiosa* com os genes de interesse ligados ao plasmídeo, mas nenhuma outra transformação apresentou crescimento.

4-Conclusão

A recombinação homóloga é um tipo de transformação que estuda o genoma funcional. Dos genes estudados pelo grupo de pesquisa, o desenvolvimento de um banco estabelece técnicas eficazes de transformação ampliando os estudos funcionais de genes associados à patogenicidade e adesão na superfície do hospedeiro (*fimA* e *hsf*) e adaptação da bactéria no hospedeiro (*msrA*, *acrA*, *cvaC* e *xpsE*).

O desenvolvimento dessas técnicas exige ser feita cuidadosamente, para se obter um maior número de transformantes uma vez que só obtive uma transformação com a construção *acrA*+puCBM21oriC.

5-Referências Bibliográficas

Souza, A.A., Takita, M.A., Coletta-Filho, H.D., Caldana, C., Yanai, G.M., Muto, N.H., Costa de Oliveira, R., Nunes, L.R., Machado, M.A. (2004) Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. FEMS Microbiology Letters. 237:341-353.

Souza, A.A., Takita, M.A., Coletta-Filho, H.D., Caldana, C., Goldman, G.H., G. M. Yanai, G.M., Muto, N.H., Costa de Oliveira, R., Nunes, L.R. & Machado, M.A. (2003)

Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. Mol. Plant. Microbiol. Interact. 16:867-875.

Machado, E.C., Quaggio J. A., Lagôa, A.M.M.A., Ticelli, M., Furlanni, P.R. (1994). Trocas gasosas e relações hídricas em laranjeiras com clorose variegada dos citros. R. Brás. Fisiol. Veg., 6: 53-57.

Machado, M. A., Coletta-Filho, H.D., Kuramae, E. E., and Takita, M. A. (2001b). Genome and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. Mol. Biol. Today 2: 33-43.

McElrone, A. J., Sherald, J. L., Forseth, 1N. (2001). Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. Plant. Dis. 85:1160-1164.

Medina, C.L. Fotossíntese, relações hídricas e alterações bioquímicas em laranjeira “Pêra” com CVC e submetida à deficiência hídrica. Campinas, SP: (s.n), 2002 Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de biologia. 147p.

Monteiro, P.B., Teixeira, D.C., Palma, R.R., Garnier, M., Bové, J.-M., Renaudim, J. Stable transformation of the *Xylella fastidiosa* citrus variegated chlorosis strain with oriC plasmids. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2263-2269.2001.

Cordeirópolis, 06 de julho de 2009.

Orientador(a): Alessandra Alves de Souza
Pesquisadora, Centro APTA Citros Sylvio Moreira-IAC

Aluna: Gabriela M. Carrer

Bolsista PIBIC/CNPq-Graduação em Ciências Biológicas, Centro Universitário Herminio Ometto

