

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Camila Caldana

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

**AVALIAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE
EXPRESSOS EM *Xylella fastidiosa* EM CONDIÇÕES
DE ADESÃO**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Camila Caldana
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Marcos A. Machado

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Machado

**CAMPINAS
2002**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
1ª CHAMADA T/11/CAMP
C126a
/ EX
OMBO BC/ 51588
ROC 16.837/102
C DX
PREÇO R\$11,00
DATA 15/11/02
Nº CPD _____

CM00176469-1

B13 ID 267693

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

C126a

Caldana, Camila

Avaliação de genes diferencialmente expressos em *Xylella fastidiosa*
em condições de adesão/Camila Caldana. –
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: Marcos Antonio Machado

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia

1.*Xylella fastidiosa*. 2.Expressão gênica. 3.Biofilme. I.Machado,
Marcos Antonio. II.Universidade Estadual de Campinas. Instituto
de Biologia. III. Título.

Banca examinadora:

Dr Marcos Antonio Machado- orientador Manoel A. Machado

Dr Gilson Paulo Manfio- _____

Dr Domingos da Silva Leite D. Leite

Dra Yoko Bomura Rosato Y. Bomura

Dr José Camillo Novello- _____

201255057

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia em Citros do Centro Avançado de Pesquisa do Agronegócio de Citros "Sylvio Moreira"(CAPTACSM) do Instituto Agrônomo de Campinas, com apoio financeiro da FAPESP

DEDICO

Com todo amor, a meus pais,
meus eternos heróis, pelo apoio constante.

OFEREÇO

A meus irmãos João Paulo (Mariana), Murilo(Renata) e Natália

Agradecimentos

Ao Dr. Marcos A. Machado, pela oportunidade, orientação e exemplo profissional;

A Alessandra Alves de Souza e Marco Aurélio Takita por todo aprendizado em Biologia Molecular e principalmente pela amizade;

Aos pesquisadores do Centro APTA Sylvio Moreira Carlos I. Aguilar-Vildoso, Helvécio Della Coletta-Filho e Gustavo Astua-Monge pelo auxílio na realização do trabalho e sugestões;

A Francisca Gonçalves da Silva Rodrigues pelos auxílios laboratoriais;

Ao Luciano Garcia Borges pelos auxílios na coleta de material vegetal;

A todos colegas do Laboratório de Biotecnologia em Citros do Centro APTA "Sylvio Moreira" pelo convivência e aprendizado. Especialmente a Francisca Alves dos Santos pelo exemplo de vida;

A Vivian Borges e Ricardo Harakava pelos auxílios em computação;

A Andréia Vigiliato pela ajuda nas questões burocráticas;

Ao pessoal do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes/ SP, chefiado pelo Dr Luis Nunes, pelo auxílio nos experimentos de microarranjos. Especialmente as amigas Nair Muto e Giane Yanai;

Ao pessoal do Laboratório de Química de Proteínas do Departamento Bioquímica da Unicamp/SP, chefiado pelo Dr José Camillo Novello, pelo auxílio na realização de 2D-PAGE, principalmente, Marcus Smolka e Paula Oblessuc;

À Dra Cláudia de Mattos Bellato, Dra Ione Salgado, Dr José Camillo Novello e Dr Marco A. Takita pelas sugestões e leituras críticas;

À Dra Eiko Kiozioka pelos "conselhos profissionais".

Às amigas Juliana Fida, Valdenice Novelli, Carla Queirós, Márcia Caldana, Maria e Josiane Alves pelo apoio total sempre;

A todos de que alguma forma contribuíram para este trabalho,

Lista de abreviaturas

2D-PAGE: eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

BCYE: meio de cultura para crescimento bacteriano (“buffered charcoal yeast extract agar”)

BSA: soro albumina bovina

C: *Xylella fastidiosa* com crescimento em meio de cultura PW

CHAPS: “3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate”

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio (“cetyltrimethylammonium bromide”)

CVC: clorose variegada dos citos

Da: daltons

DDT: dithiotheitol

DEPC: dietil-pirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDTA: ácido etilenodiametiltetracético

EPS: exopolissacarídeo

HCl: ácido clorídrico

Kb: kilo bases

L: *Xylella fastidiosa* com crescimento aderido a lâminas de lenho de laranjeira *in vitro*, propiciando a formação de biofilme

MALDI-TOF: espectrometria de massa por matriz-assistente de ionização a laser (“Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry”)

mM: mili molar

ORF: fase aberta de leitura (“open read frame”)

Pb: pares de bases

PBS: tampão fosfato salino (“phosphate buffer saline”)

PCR: reação de polimerase em cadeia (“polimerase chain reaction”)

PI: ponto de focalização isoeletrica

PMSF: fenil metil sulfonil floridro ("phenil methyl sulphoni fluoride")

PW: meio de cultura para crescimento bacteriano ("periwinkle wilt")

RAPD: polimorfismo de DNA amplificado ao acaso ("random amplified polymorphic DNA")

RNA: ácido ribonucléico

RPM: rotações por minuto

RTX: toxinas codificadas por regiões com nucleotídeos repetidos

S: *Xylella fastidiosa* com crescimento planctônico em meio com acréscimo de lâminas de lenho de laranjeira *in vitro*

SDS: dodecil sulfato de sódio ("sodium dodecyl sulfate")

TE: tris-EDTA

UFC: unidades formadoras de colônias

XDM: meio de cultura para crescimento

Índice

1. Resumo	x
2. <i>Abstract</i>	xi
3. Introdução	1
4. Revisão de literatura	2
5. Objetivos	17
6. Hipóteses do trabalho	17
7. Material e Métodos	18
7.1. Curvas de Crescimento de <i>Xylella fastidiosa</i>	18
7.2. Enriquecimento de mRNA de <i>Xylella fastidiosa</i>	21
7.3. Expressão gênica de <i>X. fastidiosa</i> em condições de adesão através de microarranjos	24
7.4. Eletroforese bidimensional de proteínas totais de <i>X. fastidiosa</i> sob condições de adesão	26
8. Resultados e Discussão	31
8.1. Curvas de Crescimento de <i>Xylella fastidiosa</i>	31
8.2. Enriquecimento de mRNA de <i>Xylella fastidiosa</i> para estudo de expressão gênica	40
8.3. Expressão gênica de <i>X. fastidiosa</i> em condições de adesão através de microarranjos	45
8.4. Eletroforese bidimensional de proteínas totais de <i>X. fastidiosa</i> em adesão	58
9. Conclusão	68
10. Referências Bibliográficas	71

RESUMO

Xylella fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa, limitada ao xilema, responsável por doenças em culturas de grande importância econômica, como a clorose variegada dos citros no Brasil e a doença de Pierce em videira. Devido à colonização de micro-ambientes específicos sujeitos a uma forte pressão, supõe-se que a bactéria possua mecanismos de agregação entre células e entre essas e a parede dos vasos colonizados. Tal interação pode estar associada com sua patogenicidade. Assim, este trabalho teve por objetivo a avaliação dos genes diferencialmente expressos de *X. fastidiosa* em resposta a uma condição de simulação de adesão *in vitro*, através da análise de “microarrays” e do padrão 2D-PAGE de proteínas. A estirpe 9a 5c foi cultivada nas seguintes condições: bactérias planctônicas (C) x bactérias crescidas em suspensão em meio com lâminas de lenho (S) e C x bactérias aderidas às lâminas de lenho (L). Foram realizadas curvas de crescimento para padronização da fase exponencial, determinada de 4 a 6 dias para C e S e de 6 a 8 dias para L. Para a análises de microarranjos, os experimentos C x S, não foram encontradas diferenças significativa na de expressão no conjunto de genes avaliados. Enquanto em C x L, foram encontrados genes do metabolismo intermediários e componentes estruturais, como os que codificam proteínas de membrana e de transporte. No padrão 2D-PAGE, não foi possível a extração de proteínas das células bacterianas aderidas às lâminas de lenho pela presença de contaminante. Na análise C x S, nós identificamos algumas proteínas diferencialmente expressas, duas proteínas de membrana e uma cisteína-protease, esta última em sua forma funcional, ou seja, sem a porção N-terminal, que parecem estar envolvidas na adesão em outros organismos. Os resultados indicaram novos genes e proteínas que podem estar envolvidas no processo inicial de adesão de *X. fastidiosa*.

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is a gram-negative and xylem-limited bacterium, which is the causal agent of diseases of several important crops, such as the Citrus Variegated Chlorosis in Brazil and the Pierce's disease in grapevine. Due the colonization in environment under high pressure, it is believed that the bacterium presents mechanisms of aggregation among the cells and between the cells and the wall of the colonized vessels. This interaction appears to be associated with its pathogenicity. This work aimed the evaluation of differentially expressed genes of *Xylella fastidiosa* in response to an *in vitro* adhesion condition through microarrays and pattern of proteins in 2D-PAGE. The strain 9a5c was grown as a planktonic population (C), planktonic population in medium containing pieces of wood (S), and bacteria adhered to the wood (L). Growth curves were done in order to standardize the exponential growth phase, which was determined to be between 4 and 6 days for C and S and between 6 and 8 days for L. In the microarray analysis, S did not show any significant difference from C in the expression pattern of the pool of genes evaluated. On the other hand, in the experiment L versus C, we identified genes belonging to the intermediary metabolism and structural components like membrane and transport proteins. For 2D-PAGE, the extraction of proteins from cells adhered to the wood was not possible because of a contaminant present in the preparation. In the analysis of C versus S, we identified some proteins differentially expressed, two membrane proteins and a cysteine protease without the N-terminal portion (functional form), which seem to be involved in adhesion in other organisms. The results uncovered new genes and proteins that could be involved in the initial process of adhesion of *X. fastidiosa*.

Introdução

A bactéria *Xylella fastidiosa*, reconhecida como fitopatógeno desde 1973, é responsável por doenças em culturas de grande importância econômica como a doença de "Pierce" em videira e a clorose variegada dos citros (CVC). As perdas econômicas decorrentes da doença provocadas por esta bactéria, no sistema produtivo tem sido significativas, chegando a inviabilizar o cultivo em determinadas áreas, como é o caso da viticultura na Flórida, e o cultivo de laranja no norte do Estado de São Paulo (Coletta Filho *et al.*, 2001).

Os hospedeiros infectados por esta bactéria apresentam sintomas de estresse hídrico, sugerindo que um dos principais mecanismos de patogenicidade de *X. fastidiosa* é a oclusão dos vasos do xilema causado, provavelmente, pela formação de biofilme (Marques *et al.*, 2002). Devido à colonização de micro-ambientes específicos, sujeitos a forte turbulência e pressão, como o xilema da planta e o canal alimentar do vetor, acredita-se que a bactéria deva possuir um eficiente mecanismo de adesão entre as células e com as paredes dos vasos colonizados (Hopkins, 1989).

A bactéria *X. fastidiosa* foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente sequenciado (Simpson *et al.*, 2000). Em seu genoma foram encontrados vários genes que podem estar envolvidos na produção de proteínas relacionadas a adesão bacteriana tanto no hospedeiro como no vetor. O grande volume de informações geradas pelo Projeto Genoma tem aberto perspectivas para inúmeros trabalhos na área funcional. Experimentos de expressão diferencial de mRNA ou proteínas podem ser meios para identificação de fatores envolvidos com a patogenicidade de um organismo.

A Clorose Variegada dos Citros (CVC)

O Estado de São Paulo é um dos maiores produtores de citros do mundo, respondendo por cerca de 30% da produção mundial. Juntamente com a Flórida, participa ainda, com 90% da produção mundial de suco concentrado. Embora as condições climáticas e de cultivo sejam apropriadas, a produtividade brasileira ainda é muito baixa quando comparada com outros países (2 caixas/árvore/ano no Brasil, contra 6 caixas/árvore/ano na Flórida), o que pode ser atribuído a fatores como pragas e doenças (Amaro *et al.*, 2001).

Levantamento realizado pela FUNDECITRUS em 2001 indicou que 36% dos pomares paulistas apresentavam sintomas da clorose variegada dos citros (CVC) (<http://www.fundecitrus.com.br/escvcbr.html>). Esta doença foi observada pela primeira vez, no Brasil, em 1987, em variedades comerciais de laranja doce (*Citrus sinensis* L.) (Rossetti *et al.*, 1990). Também tem sido relatadas em plantas cítricas da Flórida (Hopkins & Adlerz, 1988), assim como na Argentina apresentam sintomas menos severa, denominados "pecocita" (Chang *et al.*, 1993).

Os sintomas típicos da CVC incluem manchas cloróticas amareladas na face superior das folhas com deposição de goma na parte inferior, muitas vezes acompanhado de redução do tamanho foliar. Os frutos são pequenos com amarelecimento precoce, albedo duro e, portanto, sem valor comercial. Apesar de todas as variedades de laranja doce serem consideradas suscetíveis, outras variedades de citros como tangerinas, limões e alguns híbridos comerciais são considerados tolerantes. Embora a CVC seja mais problemática nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, na região Sudeste do Brasil, representa uma ameaça para todas as regiões que cultivam citros no mundo. Estudos epidemiológicos estimaram que uma planta infectada pode disseminar a doença

para cerca de 90% das árvores em uma área de 20 hectares em 12 anos (Pooler & Hartung, 1995). Tal fato pode ser atribuído à transmissão por insetos vetores que se alimentam no xilema das plantas. Uma vez contaminados na fase adulta, estes insetos podem transmitir o patógeno indefinidamente, já que a bactéria se multiplica em seu tubo digestivo (Hill & Purcell, 1995). Até o momento, cerca de 11 espécies de cigarrinhas do grupo Cicadelidae já foram identificadas como vetores da bactéria (Lopes *et al.*, 1999).

Em plantas propagadas vegetativamente, a bactéria pode se disseminar através de material contaminado, utilizado na produção clonal de novas árvores, podendo assim atingir longas distâncias. Deste modo, a utilização de mudas sadias e certificadas na formação de novos pomares é uma importante medida de prevenção da doença. Da mesma forma, a aplicação de inseticidas para o controle dos insetos vetores e a poda das partes infectadas tornam-se as únicas formas eficientes de prevenção à CVC (Coletta Filho *et al.*, 2001).

A identificação da bactéria para diagnóstico tem sido feita através de microscopia eletrônica, contraste de fase e fluorescência (Hopkins, 1988; Chagas *et al.*, 1992; Lima *et al.*, 1995), testes serológicos como DIBA ("dot immunig assay"), ELISA ("enzyme linked immunosorbent assay") e "Western blot" (Beretta *et al.*, 1993; Misanvage *et al.*, 1994), e PCR (reação de polimerase em cadeia) (Misavage *et al.*, 1994) com iniciadores específicos.

A Bactéria *Xylella fastidiosa*

X. fastidiosa é uma bactéria Gram-negativa, de crescimento muito lento, limitada ao xilema das plantas, e tem em cigarrinhas, do grupo Cicadelidae, um vetor eficiente para sua transmissão entre plantas (Hopkins, 1986). Este fitopatógeno apresenta formato de bastonete, com parede celular caracteristicamente ondulada, sem flagelos, medindo aproximadamente 0,3-0,5 μm de diâmetro e 1-5 μm de comprimento, estritamente

aeróbica (Chagas *et al.*, 1992). As células são embebidas em uma densa matriz composta provavelmente de polissacarídeos, constituindo colônias discretas e circulares (Colleta Filho, 2001). Em microscopia eletrônica, esta bactéria é observada em aglomerados na parede do vaso xilema (Hartung *et al.*, 1994).

Xylella fastidiosa foi, inicialmente, classificada como próxima a *Rochalemea quintana*, ou do tipo “rickettsiae”, devido ao crescimento lento e necessidade de um vetor para sua disseminação. Contudo, estudos comparativos de composição de DNA não comprovaram esta proximidade, uma vez que a proporção C+G de *X. fastidiosa* variou entre 49,5-53,1 mol %, enquanto que em *R. quintana* esta porcentagem de bases C+G foi de 38,5 mol %, o que indica que esta bactéria não seria próxima a *R. quintana* (Hopkins, 1973). Posteriormente, análises da região 16S RNA indicaram similaridades com o subgrupo gamma das eubactérias, que incluem o gênero *Xanthomonas*, porém diferenças fenotípicas e genotípicas permitiram sua classificação em um novo gênero que apresenta uma única espécie, *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987).

Esta bactéria possui uma ampla gama de hospedeiros, incluindo pelo menos 28 famílias de monocotiledôneas e dicotiledôneas, sem no entanto expressar sintomas (Hopkins & Adlerz, 1988). A doença de “Pierce”, em videira, foi a primeira associada a *X. fastidiosa* (Hopkins & Mollenhauer, 1973), posteriormente a “phony disease” no pessegueiro, a escaldadura das folhas da ameixeira, e em outros hospedeiros como cafeeiro, amêndoa, cerejeira, pereira, olmo, carvalho, alfafa e citros.

Apesar de todas estas estirpes pertencerem a um só grupo, diferenças de hospedeiros, patogenicidade, necessidades nutricionais e seqüência de DNA (Purcell & Hopkins, 1996) poderiam justificar a separação taxonômica em espécie, sub-espécies ou patovares (Hopkins, 1989). Inoculações mecânicas com estirpes presentes em árvores ornamentais nos Estados Unidos infectaram ameixeiras sem produzir sintomas e não se

multiplicaram em videira, pessegueiro e citros (Wells *et al.*, 1987), indicando uma diversidade patológica existente em *X. fastidiosa*.

Estudos de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) entre as diferentes estirpes sugeriram a separação em cinco subgrupos distintos: citros, ameixeira/olmo, videira/ambrósio, cerejeira e amendoeira (Pooler & Hartung, 1995). Análises da região 16S rDNA e da região intergênica 16S-23S indicaram uma homologia que variava entre 79.8 a 100% dentro de *X. fastidiosa*, sendo que as estirpes provenientes de citros, cafeeiro, pessegueiro e ameixeira são mais similares e estão separadas de videira (Metha & Rosato, 2001).

A *X. fastidiosa* causadora do CVC foi identificada em 1993 e parece diferir biológica e geneticamente das demais estirpes desta espécie (Chang, 1993). Pooler & Hartung (1995), utilizando a técnica de RAPD, identificaram uma região específica do genoma, que contém uma inserção de 28 nucleotídeos da estirpe causadora do CVC e apenas uma base alterada que a distingue da causadora da doença de "Pierce". Essa região tem sido utilizada para construção de iniciadores ("primers") que são utilizados como ferramenta para elaboração de diagnósticos da doença.

O Genoma de *Xylella fastidiosa*

X. fastidiosa foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente sequenciado (Simpson *et al.*, 2000). A estirpe sequenciada foi o isolado 9a5c, originado de laranja Valência, com a qual foi fechado o postulado de Koch (Bové *et al.*, 1992; Chang *et al.*, 1993). Seu genoma é composto por um cromossomo com 2.679.305 pares de bases e dois plasmídeos, um de 51.158 pares de bases e outro menor de 1.285 pares de bases, correspondendo a 2.448 fases de leitura aberta (ORF-"open reading frame"), sendo 43% delas semelhantes a proteínas já descritas em outros organismos. Nestes

plasmídeos parecem estar localizados genes importantes para funções metabólicas e de virulência.

Cerca de 7% do genoma apresenta homologia a seqüências de DNA de fagos, o que poderia justificar a origem da variabilidade entre as estirpes, uma vez que, bacteriófagos tem sido considerados mediadores da evolução, da transferência de fatores de virulência e surgimento de novas estirpes (Simpson *et al.*, 2000).

A estrutura básica de transcrição e tradução é semelhante a de *Escherichia coli*, apenas as ORFs que correspondem as três polimerases induzidas pelo sistema de reparo SOS de *E. coli* não foram encontradas em *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000).

Seu metabolismo energético tem o açúcar como principal fonte de energia, e foram encontrados genes da via glicolítica, do ciclo do ácido tricarboxílico e da cadeia transportadora de elétrons. Existe ainda uma via complementar da hidrólise de celulose em glicose, através das enzimas 1,4- β -cellobiosidase, endo-1,4- β -glucanase e β -glicosidase, sugerindo a possibilidade da quebra de celulose para suplementação da baixa concentração de monossacarídeos no xilema. As vias de β -oxidação e o ciclo do glioxalato estão ausentes, enquanto que as vias de neoglicogênese e pentose fosfato estão incompletas (Simpson *et al.*, 2000).

O sistema de transporte parece ser o componente central das interações patógeno/hospedeiro e em *Xylella* foram identificados cerca de 140 genes codificando proteínas relacionadas com transporte, dos quais 67 genes parecem estar associados com o metabolismo de ferro. Estes genes parecem estar associados a absorção de micronutrientes do xilema, implicando na redução de ferro e outros ions de transição, o que poderia contribuir para os sintomas típicos da doença nas folhas (Simpson *et al.*, 2000).

A resistência em plantas a bactérias patogênicas é determinado pela presença do gene de resistência (R) e um gene de avirulência (*avr*) na bactéria que apresenta

diversidade entre as espécies. Existem evidências que os genes *avr* produzem proteínas efetoras do tipo III que são percebidas pelos produtos dos genes *R* quando da invasão. Desta reação resulta a incompatibilidade levando uma reação de hipersensibilidade que consiste em uma rápida morte celular localizada e restrita ao local da infecção. Associadas ainda ao mecanismo de patogenicidade encontram-se proteínas do sistema secretor do tipo III, codificados pelos genes *hrp* de hipersensibilidade e patogenicidade. Estes mecanismos de interação planta/patógeno são relativamente conservados nas bactérias patogênicas (Kjemtrup, 2000).

Pesquisas nos bancos de sequências, Blast, (www.ncbi.nlm.nih.gov/) com todos os genes *avr* e os do sistema secretor do tipo III não identificaram similaridades com o genoma da *X. fastidiosa*. Simpson *et al.* (2000) supõem que estes genes não sejam necessários, devido a transmissão da bactéria ser por um inseto vetor.

Adesão de *Xylella fastidiosa* como Mecanismo de Patogenicidade

Embora os mecanismos de patogenicidade de *X. fastidiosa* ainda não sejam conhecidos, os hospedeiros infectados por esta bactéria apresentam sintomas típicos de estresse hídrico, o que corrobora a hipótese de que a principal causa da doença seja a oclusão dos vasos do xilema por agregados bacterianos, produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) e tiloses. A bactéria, ao colonizar micro-ambientes específicos, como o xilema da planta e o canal alimentar do vetor, sujeitos a uma forte turbulência e pressão, deve possuir um importante mecanismo de agregação entre células e a parede dos vasos colonizados (Hopkins, 1989).

Os agregados da bactéria fixam-se às paredes do elemento de vaso do xilema por fimbrias. A carga negativa resultante pode também ter a função de troca iônica, ligando e concentrando nutrientes e enzimas digestivas no agregado bacteriano (Hopkins, 1989). Foi observado que a presença do EPS pode proteger a célula de surfactantes e outros

fatores de defesa do hospedeiro como toxinas e antibióticos (O'Toole *et al.*, 2000). Da mesma forma, estes EPS parecem atuar como potencializadores na comunicação entre as células bacterianas constituintes destes agregados, de maneira semelhante a um organismo multicelular (Wolfaardt *et al.*, 1994; Van Loosdrecht *et al.*, 1990).

Esta comunidade de células microbianas, de uma ou mais espécies, aderidas a uma superfície também tem sido denominada de biofilme. A variedade de superfícies de adesão, bióticas ou abióticas, contribui com a habilidade da bactéria em sobreviver em diferentes ambientes, onde os nutrientes são escassos (O'Toole *et al.*, 2000). Da mesma forma que as bactérias podem formar um biofilme para utilização de novos recursos alimentares, também podem desagregar e voltar ao modo planctônico (vida livre) quando estes tornam-se escassos. Outros fatores como temperatura, pH, osmolaridade, oxigênio podem estar associados a este processo (O'Toole *et al.*, 2000). Algumas vezes, pode existir uma interação entre as células para formarem massa celular propiciando vantagens na sobrevivência (Watnick & Kolter, 2000).

As etapas da formação do biofilme já foram estudadas em várias espécies bacterianas como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae*, e foi observado que o processo inicial de interação com a superfície pode ser acelerado por forças geradas por certas estruturas, como pili e flagelos. Após a associação com a superfície, ocorre a formação de microcolônias. Finalmente, a produção de EPS é necessária para organização da estrutura tridimensional do biofilme (Watnick & Kolter, 2000).

Estudos genéticos da formação de biofilme de uma única espécie bacteriana indicaram múltiplas etapas, que necessitam de sinalização intercelular e regulação gênica distintas da fase planctônica (Watnick & Kolter, 2000). Contudo, algumas etapas são básicas em qualquer formação, enquanto outras são específicas para determinadas condições ambientais (O'Toole *et al.*, 2000).

Na área clínica, estima-se que cerca de 65% das doenças infecciosas são causadas por bactérias formadoras de biofilme, indicando ser este um importante fator de patogenicidade (Costerton, 2001). A formação de biofilme também já foi verificada em fitobactérias. Em *Ralstonia solanaceum*, o EPS é um importante componente para colonização sistêmica de tomate e o subsequente desenvolvimento de sintomas (Denny, 1995). Em *Xanthomonas campestris*, o EPS também parece ser necessário para virulência (Katzen *et al.*, 1998).

Marques *et al.* (2002) observaram a formação de biofilme em diferentes estirpes de *X. fastidiosa* com adesão em vidro e madeira. Em estirpes de citros e café, a organização de biofilme em madeira é um pouco diferente das demais estirpes, as células são mais dispersas com a matriz de EPS secretada por células individuais ou por um pequeno grupo de células, nos primeiros estágios de desenvolvimento. Não são observadas células alongadas ou longos filamentos de células. Também foram observados diferentes estágios de desenvolvimento de biofilme na mesma amostra. Os autores não encontraram formação de biofilme no vidro em estirpes de citros, embora esta já tenha sido relatada por Souza *et al.* (2001).

No genoma da *Xylella fastidiosa*, vários genes envolvidos na produção de proteínas relacionadas a adesão bacteriana tanto no hospedeiro como no vetor foram encontrados (Simpson *et al.*, 2000). O polissacarídeo extracelular (EPS) de *X. fastidiosa* parece ser sintetizado por enzimas codificadas por genes agrupados de maneira similar ao de *Xanthomonas campestris* que produz a goma xantana comercial. Contudo, alguns genes que codificam a goma em *X. campestris* (*gumI*, *gumL*, *gumG*) não foram encontrados em *X. fastidiosa*, sugerindo que a goma produzida pela *X. fastidiosa* seja menos viscosa que a encontrada em *X. campestris*.

Estruturas do tipo fimbrias são observadas em microscopia eletrônica em *X. fastidiosa* tanto na planta como no inseto vetor. Essas estruturas estão envolvidas na

adesão da bactéria à planta, e nas interações entre bactérias durante a colonização do xilema. No genoma de *X. fastidiosa* foram identificados 26 genes que codificam proteínas responsáveis pela formação e função de filamentos de fimbrias do tipo IV. Os genes incluem homólogos dos *pilS* e *pilR* que codificam dois componentes do sistema que controlam a transcrição das subunidades da fimbria, e *pilG*, H, I, J e *chpA* que codificam o sistema quimiostático de transdução de sinal do ambiente para os pili (Simpson *et al.*, 2000).

Outros genes possivelmente relacionados à adesão e formação de biofilme codificam três possíveis adesinas, que normalmente estão associados a patógenos de animais e humanos; duas *hsf* de *Haemophilus influenzae*, relacionadas a adesão em células epiteliais do trato respiratório (Geme *et al.*, 1996); *uspA* de *Moraxella catarrhalis* e três proteínas com alta similaridade com as hemaglutininas (*pspA*) de *Neisseria meningitidis* (Simpson *et al.*, 2000).

Outras Hipóteses de Mecanismos de Patogenicidade de *X. fastidiosa*

Apesar das evidências de que o mecanismo de patogenicidade ocorra através da oclusão dos vasos do xilema por agregados bacterianos, existem outros mecanismos que podem estar envolvidos com esta doença, entre eles:

Capacidade de migração sistêmica. Existem indícios que há um movimento lateral de *X. fastidiosa* entre os elementos de vasos do xilema, e este poderia estar associado a sua virulência (Hopkins, 1989). No genoma desta bactéria, foram encontrados genes relacionados com a produção de exo-enzimas de degradação da parede celular vegetal, sendo três endo-1,4 β -glucanases e uma celobiohidrolase (Simpson *et al.*, 2000). Esta degradação, além da função de suprimento nutricional da bactéria também poderia desempenhar papel na degradação da parede celular vegetal, importantes no movimento da bactéria, ampliando sua colonização (Hopkins, 1985).

Contudo, este número de enzimas de degradação é relativamente baixo quando comparado com outros organismos como *Ralstonia* e *Xanthomonas*, provavelmente porque *X. fastidiosa* não necessita penetrar nos vasos do xilema, pois são introduzidas diretamente pelo vetor (Colleta Filho, 2001).

Produção de toxinas. Alguns trabalhos sugerem que os sintomas foliares sejam decorrentes de toxinas (Hopkins, 1985). No genoma da bactéria foram detectados genes que codificam algumas toxinas como as hemolisinas, e quatro outras pertencentes a família das toxinas com nucleotídeos repetidos (RTX), que são importantes fatores de virulência em diversas estirpes de bactérias patogênicas Gram-negativas. Também foram encontrados precursores dos receptores de colicinas V, que são polipeptídeos antimicrobianos encontrados também em *E. coli*. Além destas toxinas, quatro genes com possível função na biossíntese de policetídeo também foram identificados (Simpson *et al.*, 2000).

Competição por nutrientes da planta. Uma vez que a bactéria vive em ambiente com baixa concentração de nutrientes, ela deve possuir um sistema eficiente de absorção de compostos produzidos pela planta e que fazem parte da composição normal da seiva do xilema. No genoma de *X. fastidiosa* foram identificados genes relacionados a absorção de micronutrientes, competindo com o hospedeiro também evidencia os sintomas e clorose.

Análise da Expressão Gênica

O sequenciamento do genoma de diversos microrganismos, entre eles, *X. fastidiosa*, tem gerado um grande volume de informação depositadas em bancos de dados. A identificação e anotação das ORFs, com auxílio de ferramentas de bioinformática, possibilitam a visualização do organismo como um todo, apesar dos erros serem inerentes ao processo. Recentes estudos em *Mycoplasma genitalium*, bactéria

responsável por doenças no trato urogenital, indicaram um erro de cerca de 8% de anotação de seus 340 genes (Pandley & Mann, 2000).

Além disso, o fluxo de informação do DNA até proteína é intermediado pelo conjunto das moléculas de RNA (transcriptoma). Assim, a morfologia e as características funcionais que um conjunto de células exibe em uma determinada condição ambiental, são resultado de uma ação combinada das proteínas presentes naquele momento, cuja regulação pode estar diretamente ligado aos níveis de mRNA daquelas determinadas proteínas.

Transcriptoma

Embora a expressão de RNA mensageiro não seja o produto final de um gene, a transcrição é o primeiro passo em sua regulação (Brazma & Vilo, 2000). Assim a concentração de determinado transcrito presente em uma célula pode ser um bom indicativo de sua necessidade naquela determinada condição. Em vista disto, foram desenvolvidas várias metodologias que permitem o monitoramento da expressão gênica.

A hibridização subtrativa de uma população de cDNA foi desenvolvida com o objetivo de identificar e isolar os genes diferencialmente expressos através da amplificação por PCR (Diatchenko *et al.*, 1996). Esta técnica foi, inicialmente, desenvolvida para o estudo de expressão de genes em eucariotos, onde oligonucleotídeos compostos de politimina (oligo d-T) são ancoradores para transcrição reversa. Em procariotos, além de cerca de 96% do RNA total ser constituído por RNA ribossômico e transportador, o mRNA não possui cauda de poli A, implicando em alterações da técnica. Su & Sordillo (1998) utilizaram sonda das regiões 16S e 23S para hibridizar com os clones e subtrair o RNA ribossômico do RNA total como forma de enriquecimento do mRNA em *Staphylococcus aureus*. Outros protocolos para enriquecimento como poliadenilação *in vitro* foram desenvolvidos para caracterização ,

por hibridização subtrativa, de mudanças fenotípicas durante o processo inicial de formação de biofilme em *Pseudomonas putida* (Sauer & Camper, 2001).

Entretanto, na hibridização subtrativa, moléculas de mRNA pouco abundantes, mesmo que estejam expressas diferencialmente, raramente amplificam, limitando a aplicação desta metodologia para identificação da expressão gênica global. Devido ao grande número de genes identificados nos projetos Genomas, técnicas como os microarranjos de DNA têm se tornado mais poderosas para análise global da expressão de vários genes simultaneamente em condições distintas (Celis *et al.*, 2000).

Normalmente, estes arranjos são feitos em lâminas de vidro por deposição de segmentos específicos de DNA, correspondendo a genes ou ORFs amplificados e distribuídos roboticamente na lâmina, denominadas "biochips". Populações de DNA complementar (cDNA), provenientes de condições diferentes são marcadas com diferentes corantes fluorescentes e hibridizados nesta lâmina. Após hibridização, detectores de fluorescência identificam a intensidade de cada gene ou ORF na lâmina, indicando os diferentes níveis de expressão em cada condição.

Esta metodologia parece bastante eficiente principalmente para procariotos que possuem genomas pequenos, permitindo a identificação dos processos globais. Em *Pseudomonas aeruginosa*, os microarranjos de DNA foram utilizados para estudo da expressão gênica durante a formação de biofilme. Foram comparadas as expressões gênicas das bactérias planctônicas com àquelas formadoras de biofilme, onde foram encontrados cerca de 34 genes ativados contra 39 reprimidos em populações de biofilme (Whiteley *et al.*, 2001).

Em *X. fastidiosa*, devido ao projeto Genoma Funcional, financiado pela Fapesp, vários trabalhos tem sido desenvolvidos utilizando a tecnologia de microarranjos. Trabalhos comparando padrões de crescimento rápido e lento *in vitro*, crescimento em

meios de cultura com diferentes extratos vegetais e condições de estresse oxidativo tem sido realizados em *Xylella* com esta metodologia (www.fcav.unesp.br/funcional)

Souza *et al.* (2001) identificaram as diferenças de expressão entre bactérias com capacidade de adesão em superfície abiótica (vidro), e as que perdem esta capacidade. Foram encontrados 8 genes envolvidos na adesão responsáveis pela biossíntese de polissacarídeos e lipopolissacarídeos, além de 3 genes relacionados com a produção de EPS. Também foram identificados genes envolvidos com produção e transporte de toxinas, absorção de ferro e funções regulatórias.

Proteínas em Géis Bidimensionais (2D)

Apesar de muitos estudos funcionais permitirem uma abordagem global da expressão gênica, através da análise dos níveis de mRNA, torna-se importante a identificação das proteínas codificadas por estes genes. Em uma célula, podemos detectar a presença de uma proteína sem a existência de mRNA devido a instabilidade desta molécula. Da mesma forma, podemos encontrar níveis de mRNA sem a presença da proteína traduzida.

A partir das seqüências de DNA fornecidas pelo sequenciamento do genoma dos diversos organismos, pode-se deduzir a seqüência de aminoácidos das proteínas por elas codificadas, porém pouco se revela sobre sua função biológica. Além disso, mecanismos de modificações pós-traducionais, como glicosilações e fosforilações, indicam que o estudo da expressão das proteínas é essencial para a análise dos processos e sistemas biológicos. Esta análise global dos níveis de proteínas também é chamada de proteoma (Gygi *et al.*, 2000).

Proteoma é o estudo em larga escala de proteínas expressas em um organismo envolvido em um processo particular, através de métodos bioquímicos, que incluem não

só a identificação e quantificação, mas também a determinação de sua localização, modificações, interações, atividades e funções (Field, 2001).

Os primeiros estudos, nesta área, foram realizados no final da década de 70, quando alguns pesquisadores construíram um banco de dados utilizando a técnica de eletroforese 2D-PAGE descrita por O'Farrel (1975), com pouca repercussão pela baixa sensibilidade da técnica e pela explosão de métodos mais diretos como PCR e sequenciamento. Apenas na década de 90, a maioria das limitações da análise de proteínas foram removidas com o surgimento e associação de técnicas analíticas mais poderosas, como a espectrometria de massa (Pandley & Mann, 2000).

O princípio da eletroforese 2D é a combinação da separação das proteínas com base na carga elétrica, utilizando o ponto de focalização isoeletrica (IEF), seguida por uma separação de peso molecular, através do SDS-PAGE, permitindo a visualização global das proteínas expressas em um determinada condição. Apesar disto, é uma técnica trabalhosa e com algumas limitações como a rara detecção de algumas classes de proteínas como as hidrofóbicas ou as de alto peso molecular, ou em baixa abundância (Yates & Wasburn, 2000) e a falta de reproducibilidade inerente da variação biológica das próprias amostras (Pandley & Mann, 2000).

Apesar das limitações, ainda assim é considerada uma metodologia eficaz, principalmente, em microrganismos, onde permite uma visão geral do proteoma simples, no caso de identificação de modificações pós-transcricionais ou ainda quando utilizada em conjunto com outras técnica que permitam a caracterização das proteínas separadas nos géis 2D. A espectrometria de massa permite a identificação destas proteínas através da massa de seus peptídeos, provenientes de digestão parcial com uma protease sequência-específica, como a tripsina. A razão da análise dos peptídeos, ao invés das proteínas, é que estas separadas em gel são dificilmente eluídas, portanto a massa não seria suficiente para identificação em bancos de dados (Pandley & Mann, 2000).

A análise de proteínas diferencialmente expressas tem sido utilizada no estudo de vários microrganismos. Em *Pseudomonas putida* foram estudadas as primeiras etapas durante ao processo de adesão, e foram identificadas cerca de 15 proteínas induzidas e 30 reprimidas (Sauer & Camper, 2001).

Em *X. fastidiosa*, dentro do Projeto Genoma Funcional (FAPESP) (<http://proteome.ibi.uincamp.br/>), o mapa 2 D referência foi elaborado e cerca de 110 proteínas já foram identificadas por espectrometria de massa, incluindo proteínas secretadas que também parecem ter papel fundamental na adesão (Smolka *et al.*, 2001). Apesar do mapa 2D e do banco de dados já estar estabelecido, existe a carência da utilização de modelos biológicos para o entendimento do mecanismo de patogenicidade.

Considerando que grande parte da patogenicidade da bactéria esteja associada à capacidade de colonização e bloqueio dos vasos do xilema da planta hospedeira e, em função deste hábito, a bactéria possui grande capacidade de interação com superfícies, seria possível simular condições de crescimento *in vitro* que se assemelham ao crescimento da bactéria dentro da planta hospedeira. Assim, procurando se apoiar em hipóteses de patogenicidade e na existência de genes homólogos em *X. fastidiosa*, a estratégia normalmente utilizada para avaliação da expressão gênica tem sido a análise e caracterização de mRNA e proteínas diferencialmente expressos em condições que se assemelhem àsquelas *in vivo*. Desta forma, a simulação de condições que favoreçam a adesão pode auxiliar na avaliação de genes expressos nesta condição.

Hipóteses do Trabalho

1. Grande parte da patogenicidade da bactéria *Xylella fastidiosa* está associada à sua capacidade de colonizar e bloquear os vasos do xilema da planta hospedeira.
2. Em função deste hábito, *X. fastidiosa* é uma bactéria que pode apresentar capacidade de interação com superfícies dos vasos xilema e por ela mesma no processo de formação de colônias.
3. É possível simular as condições de crescimento *in vitro* que se assemelham às condições de crescimento da bactéria dentro do hospedeiro.
4. O crescimento em meios que favoreçam as condições de adesão poderia ser uma estratégia de avaliação de genes expressos nestas condições.

Objetivos

- Estabelecer condições de cultivo que promovam a adesão da bactéria *Xylella fastidiosa*.
- Avaliar genes diferencialmente expressos nas condições de crescimento em que favoreçam a adesão e nas condições de crescimento planctônico.
- Comparar, através de eletroforese bidimensional, o padrão de proteínas expressas nas condições de crescimento de adesão e planctônico.

1. Curvas de crescimento de *Xylella fastidiosa*

1.1. Condições de cultivo

A estirpe 9a5c de *Xylella fastidiosa* foi cultivada nos meios PW (“periwinkle wilt”) (Davis *et al.*, 1981); XDM, (“*Xylella* defined medium”) (Lemos, comunicação pessoal) e BCYE modificado (“buffered charcoal yeast extract”) (Wells *et al.*, 1981). Para avaliar a influência de lâminas do lenho na taxa de crescimento da bactéria, o meio PW foi modificado acrescentando-se: 1) com eluído xilemático (PW+eluído); 2) com lâminas longitudinais de lenho (PW+lenho), e 3) com eluído xilemático e com lâminas longitudinais (PW+eluído+lenho).

Os cortes para obtenção das lâminas longitudinais de lenho foram obtidos de ramos de laranjeira “Pêra” (*Citrus sinensis* cv Osbeck), autoclavados três vezes em água bidestilada, sendo a água substituída a cada esterilização. Em seguida, as lâminas foram inseridas em meio de cultura, na quantia de 2,5 g/50 mL de meio PW. Para obtenção do eluído xilemático, pedaços de 10cm do caule de laranjeira “Pêra” foram colocados em sistema de filtragem a vácuo, por onde foram passados 10mL de água destilada autoclavada. Após coleta, este eluído foi filtrado em filtro Milipore 0,22µm e acrescido em meio de cultura (10 % v/v).

1.2. Estimativas da multiplicação bacteriana

1.2.1. Avaliações de diferentes meios de cultura para *X. fastidiosa*

Para avaliação da multiplicação bacteriana nos seis diferentes meios de cultura foram preparados quatro repetições constituídas de Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL

dos meios líquido PW (controle), PW+eluído xilemático, PW+lenho, PW+eluído xilemático+lenho, XDM e BCYE modificado. Para cada meio de cultura foi reservado um controle sem inóculo. Foram retiradas duas alíquotas de 1mL de cada parcela e destas foram medidas a absorvância a 630nm em intervalos de 12 horas. A eficiência de Tween 80 nestas leituras foi avaliada nas concentrações de 0,1 a 10%. A contagem das células bacterianas foi feita em Câmara de Neubauer a cada 24 horas.

1.2.2. Avaliação do crescimento em modelo de adesão

Para melhor caracterização do efeito do xilema no crescimento de *X. fastidiosa in vitro* e para monitoramento de sua adesão a este tecido, em um segundo experimento, foram avaliados métodos de determinação da multiplicação bacteriana nos meios PW e PW+lenho. As leituras foram feitas a cada 24 horas, utilizando como parâmetros número de células avaliadas em Câmara de Neubauer, teor de DNA total e número de unidades formadoras de colônias (UFC), através da contagem do número de células viáveis em meio BCYE sólido com as diluições feitas em tampão salino (PBS) (20mM de NaHPO₄; NaCl 0,8%).

A extração de DNA foi realizada pelo protocolo de Dunigan (1989), com lise pela adição de TE pH 8.0, proteinase K 100µg/mL e SDS 0,5 %, a 37° C por 1 h. Em seguida, foram adicionados 100µL de NaCl 5M e 80µL de CTAB 10% e as amostras foram incubadas a 65°C. Duas extrações com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foram feitas antes da precipitação com etanol. O DNA resultante foi ressuspensionado em 50 µL 1/10 TE com RNase (20µg/mL). A concentração de DNA total foi determinada em absorvância de 260nm e monitorada por gel de agarose 1%.

Para o experimento de adesão, foram preparados 15 Erlenmeyers de 250mL com 50mL de meio PW e 20 de PW + lenho. Cada frasco foi utilizado para apenas uma leitura. Nos tratamentos com lenho, o meio de cultura foi decantado e as lâminas de xilema

lavadas com igual volume de PBS e mantida sob agitação por 30 min, a 120rpm. Uma alíquota desta solução foi plaqueada em meio BCYE sólido e as unidades formadoras de colônias contadas após 21 dias de cultivo. O crescimento e agregação das bactérias nas lâminas de lenho foram também monitorados por microscopia óptica. Todas as condições foram mantidas sob temperatura controlada a 28° C.

1.3. Análise Estatística das Curvas

Cada parcela experimental consistiu de 50mL de meio de cultura por Erlenmeyer/tratamento. Os dados coletados foram transformados pela \sqrt{x} para ajuste à distribuição normal, segundo o teste W de Shapiro-Wilk com auxílio do Programa Statistica.6.0 (StatSoft, 1995). O delineamento experimental foi realizado em subparcelas divididas no tempo, sendo que a disposição das parcelas experimentais foi inteiramente casualizadas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey 5%. Os dados foram avaliados pelo programa Estat 5.0.

Para as estimativas do tempo de geração foram utilizados os pontos correspondentes à fase exponencial da curva de crescimento de células viáveis, enquanto que para morte celular, os pontos de queda de crescimento. A fórmula utilizada para o cálculo foi:

$$N_x = N_0 + 2^{t/G}$$

onde,

N_x = número de células estimadas

N_0 = inóculo inicial

t = tempo

G = tempo de geração

2. Enriquecimento de mRNA de *Xylella fastidiosa* para estudo de expressão gênica

2.1. Extração de RNA total

O isolamento do RNA total foi realizado segundo protocolo descrito por Rhodius (www.microarray.org/protocols.html). Através da análise das curvas de crescimento foi padronizado que as bactérias seriam cultivadas até sua fase exponencial, ou seja, para Controle (C): bactérias livres (fase planctônica), 96 horas e para as bactérias aderidas às lâminas de lenho (L), 156 horas. As células foram lisadas com 0,5 mg/mL de lisozima em TE pH 8,0 e 0,1 volume de 10 % SDS. Para L, as lâminas foram maceradas em nitrogênio líquido, adicionando-se esta solução no mesmo volume do macerado. As amostras foram incubadas a 64°C seguida da adição de 0,1 volume de 1M acetato de sódio e igual volume de fenol saturado com água. Após a extração, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi adicionado mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Em L, esta primeira etapa foi repetida por mais uma vez. Após centrifugação, o RNA foi precipitado na fase aquosa com 0,1 volume de 3 M acetato de sódio, 1mM EDTA e 2,5 volumes de etanol 100%. O RNA resultante foi ressuscitado em 200 µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) e submetido a tratamento com 10 unidades de RNase-free DNase (Boehringer Mannheim) e 36.3 unidades de "RNAguard" inibidor de RNase (porcine) (Armesthan Pharmacia) por 30 min. Uma extração adicional com fenol:clorofórmio e duas com clorofórmio foram realizadas antes da precipitação com etanol. O produto foi ressuscitado em 40µL de água tratada com DEPC. A concentração de RNA foi estimada a 260nm admitindo 1 absorvância = 40µg/mL de RNA (Sambrook *et al.*, 1989) e a integridade do RNA foi analisada em gel denaturante de agarose 1%. As amostras foram armazenadas a -80° C.

2.2. Enriquecimento do RNA mensageiro

Para eliminar o RNA ribossômico foi utilizado o clone 00J11 do projeto genoma de *X. fastidiosa*, contendo as regiões 16S e 23S. Para confirmação da inserção foram desenhados iniciadores que flanqueiam esta região. Posteriormente, foi realizado PCR com 100 ng de DNA; 1 µL do dNTP (10mM); 5 µL do *Pfu* buffer 10x; 50 ng da cada "primer" (direto e reverso) e 0,5 µL da enzima *Pfu* (2,5µg/µL). A reação foi feita utilizando o seguinte programa: 3min a 94° C, 35 ciclos de 1min a 94° C; 1min a 60°C e 10min a 72°C seguido de um período de extensão de 10 min a 72°C. O padrão de amplificação foi avaliado em gel de agarose 1%.

Confirmada a inserção do fragmento desejado, foi feita digestão do clone com as enzimas *SaII/BglII* (Gibco) e do vetor p-GEM3Z(+) (Promega) com as enzimas *SaII/BamHI* (Gibco). Após digestão, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 1% com baixo ponto de fusão ("low-melting") e os fragmentos desejados foram purificados com Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Pharmacia Biotech). Em seguida, o vetor e o fragmento 16S/23S foram ligados pela enzima *T₄* DNA ligase (Gibco) a 16° C por toda noite. Para confirmação de que os transformantes continham o inserto desejado, seus plasmídeos foram purificados e seqüenciados.

Os clones positivos foram linearizados por digestão com a enzima *SaII* (Gibco) a 37° C, a noite toda, e purificados por kit GFX. Após linearização, o clone, contendo a região 16S/23S foi utilizado para a transcrição *in vitro*, através do kit "RiboMax Large Scale Production System" (Promega) para gerar a fita antisense marcada com biotina utilizando a enzima *T₇* RNA polimerase. O RNA ribossômico marcado foi hibridizado com o RNA total por 30 min a 37° C e os componentes foram misturados a streptavidina e incubados por 20 min em temperatura ambiente, seguido de extração por fenol:clorofórmio. O RNA

mensageiro enriquecido foi dissolvido em 30 µL de água DEPC e visualizado em gel denaturante de agarose 1%.

2.3. RT-PCR (Transcrição reversa-PCR) com iniciadores dos genes *rpfs*.

Como forma de comprovar a integridade do RNA mensageiro enriquecido, foi realizada a síntese da 1ª fita de cDNA, utilizando "Random primers"(Gibco) e M-MVL "Reverse Transcriptase" (Gibco), tanto das amostras enriquecidas como das não enriquecidas (proveniente de RNA total).

Com o cDNA sintetizado foi feita uma amplificação com 1 µL do dNTP (10mM); tampão 10X de PCR; 2,5 unidades da enzima *Taq* polimerase; 1mM de MgCl₂, 50 ng da cada iniciador (direto e reverso). Foram utilizados os iniciadores específicos para os genes *rpf* (fatores reguladores de patogenicidade) B, F e G. A reação foi feita utilizando o programa: 3min a 94° C, 35 ciclos de 1min a 94° C; 1min a 55°C e 3min a 72°C seguido por extensão de 1 min 72°C. As amplificações foram visualizadas em gel de agarose 1%.

2.4. Hibridização Subtrativa

Após confirmação do enriquecimento do RNA mensageiro, foi feita a síntese da 1ª fita de cDNA utilizando "Random primers" (Gibco) e M-MLV "Reverse Transcriptase" (Gibco), tanto das amostras C quanto de L. A síntese da 2ª fita de cDNA, foi feita com a DNA polimerase I e RNase H. O cDNA da condição L foi dividido em duas alíquotas e cada uma foi ligada com um tipo específico de adaptador (1 e 2) conforme instruções do Kit da Clontech (PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit). Após ligação fez-se a primeira hibridização subtrativa, onde as fitas de cDNA em excesso previamente desnaturadas de C foram misturadas com as fitas de cDNA do L contendo os adaptadores 1 e 2. As amostras foram incubadas à 63°C por 1:30h, em seguida, foi procedida uma segunda subtração misturando as reações contendo L ligado ao adaptador 1 + C e L ligado ao adaptador 2 + C. A segunda hibridização foi realizada a 63°C durante a noite.

Terminado o processo de subtração, foi feita PCR para amplificar as moléculas de cDNA diferencialmente expressas que, conseqüentemente, contém os adaptadores 1 e 2. Nesta reação, foi utilizado um iniciador que se anela a uma região comum nos adaptadores 1 e 2. Posteriormente, para maior amplificação foi realizado uma amplificação da região interna ("nested-PCR") utilizando um par de iniciadores específicos para cada adaptador que anelam mais internamente na fita molde.

O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1,5% com baixo ponto de fusão ("low melting") e as bandas diferencialmente expressas foram purificadas. Os fragmentos foram clonados no plasmídeo pGEM-T (Promega) e utilizados na transformação de células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α . As colônias transformadas foram selecionadas em meio LB contendo ampicilina e IPTG + X-gal. Os clones foram seqüenciados e as seqüências identificadas em bancos de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast; www.aeg.ibi.ic.unicamp.br/xf).

2.5. Sequenciamento de DNA

A reação de seqüenciamento de DNA foi feita com o kit "Big Dye" (Applied Biosystems) utilizando o iniciador T₇ direto do vetor pGEM-T. O programa utilizado para a reação foi: 1min e 30 seg a 96°C; 25 ciclos de 10 seg a 96°C; 5 seg a 50°C e 4 seg a 60°C. A reação foi purificada por precipitação de isopropanol 75%, seguida de lavagens com etanol 70%. As amostras secas e ressuspensas em seqüenciador automático ABI PrismTM-3700 (Applied Biosystems).

3. Expressão gênica de *X. fastidiosa* em condições de adesão através de microarranjos

3.1. Amplificação das ORFs e Preparo do "Biochip"

(Realizado pelo Núcleo Integrado de Biotecnologia/UMC)

O DNA genômico de *X. fastidiosa* foi amplificado por PCR, com a utilização de iniciadores que amplificam fragmentos da região interna das ORFs descritas no sequenciamento do genoma desta bactéria (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf>). Os produtos de PCR foram purificados e avaliados em gel de agarose. Estes produtos foram então fixados em lâminas de vidro conforme descrito "manual Affymetrix 417 Array Application v. 1.5". Um total de 2200 ORFs foram fixadas em quatro quadrantes com três replicatas na mesma lâmina.

3.2. Marcação com fluorescência de cDNA a partir de RNA total

Para os microarranjos, foram extraídos RNA de três condições de cultivo: (1) Controle, só meio PW (C): população de bactéria livres (fase planctônica) apenas em meio PW; (2) S: população de bactéria crescida em suspensão em meio com lâminas de lenho; e (3) L: população de bactéria aderida às lâminas de lenho.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 20µg de RNA total, em reação contendo "first strand buffer", 0,1 M dithiothreitol (DTT), dNTP 2,5mM, mix de iniciadores ("primers") de ORFs de *Xylella*, inibidor de Rnase e Superscript II transcriptase reversa realizada a 42°C por 2 h. O RNA proveniente desta reação foi então removido por tratamento com NaOH, seguido da adição de HCl para restabelecimento do pH. A síntese da segunda fita de cDNA foi sintetizada com dNTP (15mM dCTP, 25mM dGTP, 25mM dATP, 25mM dTTP), "random primer solution", enzima Klenow e marcação com os fluoróforos "Cy3-dCTP" ou "Cy5-dCTP" (Amersham Pharmacia Biotech). A reação foi incubada a 37°C por 2 h.

3.3. Hibridização e Análise

As duas populações de cDNA marcadas, provenientes dos tratamentos C e L ou de C e S, foram misturadas e lavadas com água em filtro Microcon 30. Em seguida foi

acrescentado solução de hibridização (6x SSC, 0,5% SDS, 5x Denhardt's (Sigma), 0,25mg/mL de DNA de espermatozóide de salmão (Sigma) e as amostras foram desnaturadas a 95° C por 5 min. As amostras foram então colocadas em estação de hibridização GeneTac (Affymetrix). Após a hibridização, as lâminas foram lavadas, secadas e escaneadas por GMS 418 scanner (Affymetrix) sensível a fluorescência.

Cada lâmina foi analisada pelo software Jaguar II (Affymetrix). A partir da análise dos experimentos isolados, foi criado um banco de dados pelo programa Micro Data Base com diferentes experimentos provenientes das mesmas condições. Os dados gerados foram submetidos ao teste estatístico de análise de variância, SAM, desenvolvido especificamente para análises de microarranjos (Tusher *et al.*, 2001).

4. Eletroforese bidimensional de proteínas totais de *X. fastidiosa* sob condições de adesão

4.1.Extração de Proteínas

Da mesma forma que nos microarranjos, as bactérias foram cultivadas em três condições, em meio PW com ausência de soro albumina bovina (BSA): (1) Controle, só meio PW (C): população de bactéria livres (fase planctônica); (2) S: população de bactéria crescida em suspensão em meio com lâminas de lenho; e (3) L: população de bactéria aderida às lâminas de lenho. As células provenientes de C e S foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos, e o sedimento obtido foi utilizado para extração de proteínas. Em L, as lâminas foram maceradas em nitrogênio líquido. A mesma quantidade de lâminas acrescidas em meio decultura, porém sem bactérias, também foi macerada e foi acrescida solução de extração. Este procedimento foi realizado para controlar contaminação de proteínas do tecido vegetal.

As células foram lisadas em tampão (SDS 2%, PMSF 2mM, EDTA 5 mM, Tris 20mM pH8.8, solução de inibidores de proteases 1:100, DTT100mM) mantido em gelo por

cerca de 30 min, com agitação constante. As amostras foram aquecidas a 95° C por 5 min, seguida por centrifugação e precipitação com acetona:etanol (50:50).

Após precipitação, as amostras foram suspensas em tampão (SDS 0,5%, PMSF 2mM, EDTA 5 mM, Tris 20mM pH8.8, DTT100mM), centrifugadas e o sobrenadante aliqotado em frações com cerca de 100µg, armazenados a -80° C.

4.2. SDS-PAGE

Como forma de certificação de que o padrão de proteínas era característico de *X. fastidiosa*, e que na condição L não houve contaminação de proteínas das lâminas de lenho, foi realizado primeiramente um SDS-PAGE para as três condições de cultivo. Cerca de 20 µg de proteínas de cada amostra foram preparadas com tampão de amostra 3x concentrado (SDS 6%, Glicerol 30%, Tris-HCl pH 6.8 0.15M, azul de bromofenol) e 0,1M de DDT. Antes de serem aplicadas, as amostras foram desnaturadas a 95° C por 3 min, centrifugadas por 2 min a 14000 rpm, e cerca de 10 e 15 µg foram aplicadas em gel de acrilamida 12,5%. Amostras de C e L também foram aplicadas em gel de acrilamida 9% para identificação de proteínas de alto peso molecular.

4.3. 2D-PAGE

4.3.1. Focalização Isoelétrica (1ª Dimensão)

Cerca de 75 µg de proteína foram adicionadas em 340 µl de tampão de amostra da 1D (uréia 8M, CHAPS 4%, anfólitos 2% carregado com pH 3-10, DDT 70mM, e azul de bromofenol), centrifugada e o sobrenadante aplicado na 1D. Foi utilizado gel de poliacrilamida desidratado como imobilizador de pH, tiras de IPG (Armeshan Pharmacia Biotech) com alcance de pH entre 3-10 NL. As tiras foram reidratadas no próprio tampão de amostra por 16 horas a 20° C.

A focalização isoeétrica foi efetuada à 300V por 10 minutos; 3000V por 3 horas; 4000V por 16 horas; 6000V por 20 horas; até atingir 8000V pelo sistema IPGphor (Amersham Pharmacia Biotech).

4.3.2. SDS-PAGE (2ª Dimensão)

Após 1D, as tiras foram equilibradas por 8 min em solução de Tris-HCl 50mM pH 6,8, uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2% e DTT 2%, seguida de solução de Tris-HCl 50mM pH 6,8, uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, iodoacetamida 2,5% e azul de bromofenol por 12 min. Posteriormente, as faixas foram colocadas em gel de poliacrilamida 12,5% e cobertas com agarose 0,1%. A corrida foi realizada no SE-600 (Amersham Pharmacia Biotech) 10° C, com voltagem fixada a 90V por 30 min e então a voltagem passou a ser livre e a amperagem constante a 30mA/gel por, aproximadamente, de 3 a 4 horas. Depois de corados os géis foram escaneados no Laser Personal Densitometer SI (Amersham Biosciences).

4.4. Coloração das proteínas por impregnação com prata

A coloração das proteínas com nitrato de prata foi efetuada segundo protocolo de Blum *et al.* (1987) modificado. As soluções foram utilizadas seqüencialmente: fixador (metanol 50%, ácido acético 12%, 0,3 mL formaldeído 37%) por 2 horas; etanol 50% três vezes de 20 min; solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,2%) por 1 min; três lavagens com água destilada de 20 seg; solução de impregnação (nitrato de prata 0,2%, 0,225 mL formaldeído 37%); três lavagens com água destilada de 1 min; solução reveladora (carbonato de sódio 6%, tiosulfato de sódio 0,4%, 0,2 mL de formaldeído 37%) até o surgimento de bandas ou spots; solução bloqueadora (ácido acético 5%).

Para proteínas utilizadas em espectrometria de massa, o protocolo de coloração foi semelhante, exceto pelas lavagens com etanol 50%, e pela ausência de formaldeído nas soluções.

4.5. Coloração de proteínas com Comassie Blue

Os géis foram submersos em solução contendo 54% de metanol, 13,5% de ácido acético e 0,27% de Comassie brilliant blue por 1 hora com agitação lenta. Esta solução foi substituída pelo descorante com 30% de metanol e 10% de ácido acético, trocados a cada 15 min até a visualização das bandas ou “spots”.

4.6. Análise das Imagens

O software Image Master, versão 3.01, (Amersham Pharmacia Biotech) foi utilizado para detecção dos “spots” e calibração pI/peso molecular. Os “spots” diferenciais foram classificados por ausência ou presença nas duas condições. As proteínas diferenciais foram identificadas por espectrometria de massa.

4.7. Espectrometria de Massa

As proteínas diferencialmente expressas foram selecionadas e os “spots” cortados, colocados em solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônia 25 mM para retirar qualquer contaminação e excesso de corante, e lavados em água bidestilada. Em seguida, o gel foi picotado e lavado por 2 vezes em solução de acetonitrila 100%, para desidratação. Foi acrescida a amostra solução de tripsina 1 µg/µl diluída em bicarbonato de amônia 50mM e foi mantida por 40 min em gelo, seguida de incubação a 37° C durante toda a noite.

Após digestão, a amostra foi centrifugada e lavada com acetonitrila 50% e ácido fórmico 5% por 3 vezes. A amostra foi pipetada por cerca de 5 vezes em coluna de C18

(ZipTip) ajustada a uma micropipeta, seguida de matriz e fixada em placa de MALDI-TOF. Os peptídeos foram identificados em MALDI-TOF Voyager-DEpro e analisados pelo programa Voyager Instrument (Applied Biosystems). As massas destes peptídeos foram comparadas no banco de dados do Genoma de *X. fastidiosa*, através do programa MS-Fit (UCSF, <http://prospector.ucsf.edu/>).

Resultados e Discussão

1. Curvas de crescimento de *X. fastidiosa*

1.1. Curvas de Crescimento de *X. fastidiosa* em diferentes meios de cultura

As curvas de crescimento da estirpe 9a5c de *Xylella fastidiosa*, nos diferentes meios de cultura, foram realizadas através da contagem do número de células e de leituras de absorvância. Como avaliação preliminar para a determinação do intervalo de tempo adequado para coleta das amostras, foram efetuadas medições a cada 12 horas (dados não apresentados). A análise estatística detectou diferenças significativas somente quando as médias eram no mínimo entre duas avaliações subseqüentes. Assim, foi estabelecido que, para determinação da curva de crescimento nos diferentes meios para *X. fastidiosa*, o melhor intervalo de tempo entre as avaliações foi de 24 horas.

Na determinação da densidade óptica e, principalmente, da contagem de células na Câmara de Neubauer podem ter ocorrido sub-estimativas, uma vez que *X. fastidiosa* tem como característica formação de agregados (Hopkins, 1989), o que dificulta a contagem real de células. Em bactérias com esta característica, como as do gênero *Xanthomonas*, o detergente Tween 80 tem sido utilizado para minimizar a ação de EPS, reduzindo os agregados celulares e facilitando assim a contagem para o estabelecimento das curvas de crescimento. Entretanto, a adição de Tween 80 nas concentrações de 0,1 a 10%, antes das leituras não promoveu modificações nos agregados celulares.

As leituras de absorvância a 630nm dos diferentes meios são apresentados na Tabela 1. Observou-se que o crescimento nos meios PW, incluindo lenho, eluído xilemático, lenho + eluído xilemático foram semelhantes entre si e superiores ao crescimento determinado nos meios BCYE modificado e XDM (Figura 1). Nas suplementações com lenho, notou-se uma maior leitura da absorvância a 630nm, que

poderia ser associada a uma maior taxa de crescimento ou a uma liberação de substâncias extracelulares, que absorveriam na mesma frequência.

As bactérias cultivadas no meio XDM apresentaram fase inicial ou "lag" de crescimento bem pronunciada, que pode ser explicada pelo pré-inóculo ser em PW, que é de composição nutricional mais rico. Assim esta fase "lag" poderia estar correspondendo a uma adaptação da bactéria a condições nutricionais inferiores a que se encontrava no pré-inóculo. A curva de crescimento obtida a partir do meio BCYE modificado apresentou padrão sigmóide muito parecido com as do meio PW, contudo com menores taxas de crescimento. Do mesmo modo que na determinação da densidade óptica, nas contagens de células em Câmara de Neubauer (Tabela 1), houve maior taxa de crescimento nos meios PW do que nos meios BCYE e XDM. Contudo, no meio XDM a taxa de crescimento apresentou fase "lag" menos acentuada que na curva obtida através da absorvância (Figura 2).

Amostras em PW suplementadas com lenho + eluído também apresentaram crescimento superior às demais, embora entre os meios PW não foram observadas diferenças significativas (Figura 02). Desse modo, o acréscimo de material vegetal, lenho ou eluído, não promoveu diferenças na taxa de crescimento da bactéria. Portanto, as diferenças detectadas em absorvância, quando comparadas com número de células, não seriam devido, exclusivamente, à multiplicação celular, mas a uma maior liberação de substâncias no meio, como por exemplo EPS. Por este motivo, houve uma menor diferença estatística entre os meios na contagem do número de células do que para a densidade óptica.

Embora a taxa de crescimento bacteriano entre os meios suplementados com eluído xilemático e lâminas de lenho tenha sido semelhante, este último modelo foi, recentemente, utilizado para estudo do processo de adesão por microscopia em

diferentes estirpes de *X. fastidiosa* (Marques et al., 2002), reforçando um estudo mais detalhado desta simulação.

Tabela 1 – Taxa de crescimento média de *Xylella fastidiosa* em diferentes meios de cultura, avaliada por absorvância a 630nm e número de células .

Meio de cultura	Absorvância (630nm)	Número de células (x10 ⁶ /mL)
PW Lenho + Eluído	0.3139 A	11.2 A
PW Lenho	0.3107 AB	11.1 A
PW	0.2759 BC	11.0 A
PW Eluído	0.2602 CD	10.8 A
BCYE modificado	0.2383 DE	9.5 B
XDM	0.2082 E	8.2 B

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

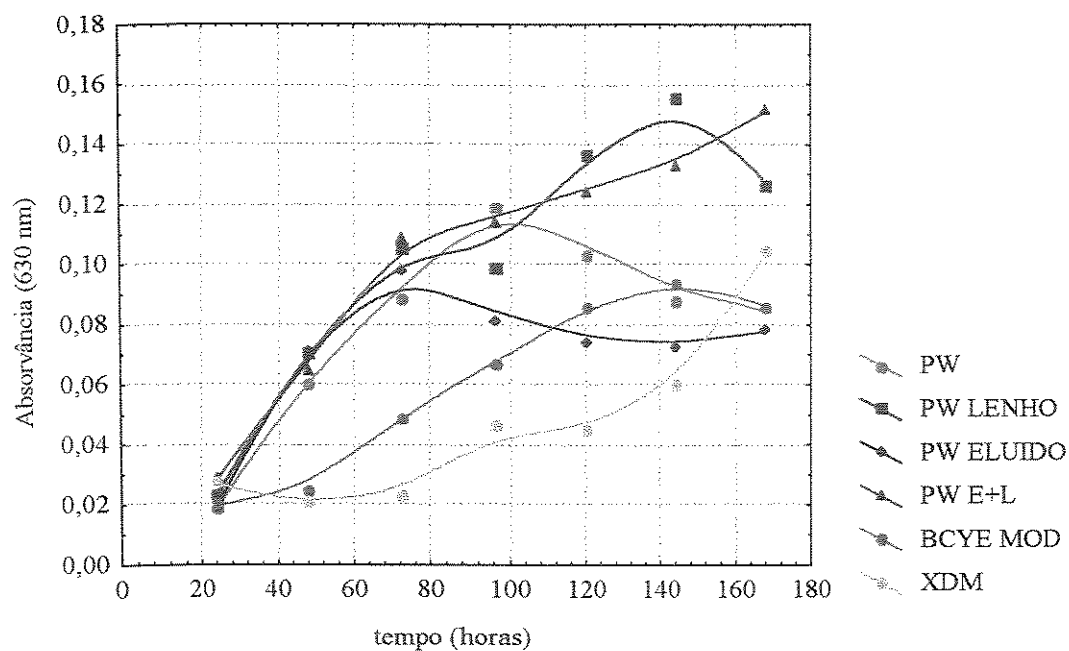


Figura 1- Curva de crescimento da *Xylella fastidiosa* nos diferentes meios cultura determinada pela absorbância 630nm

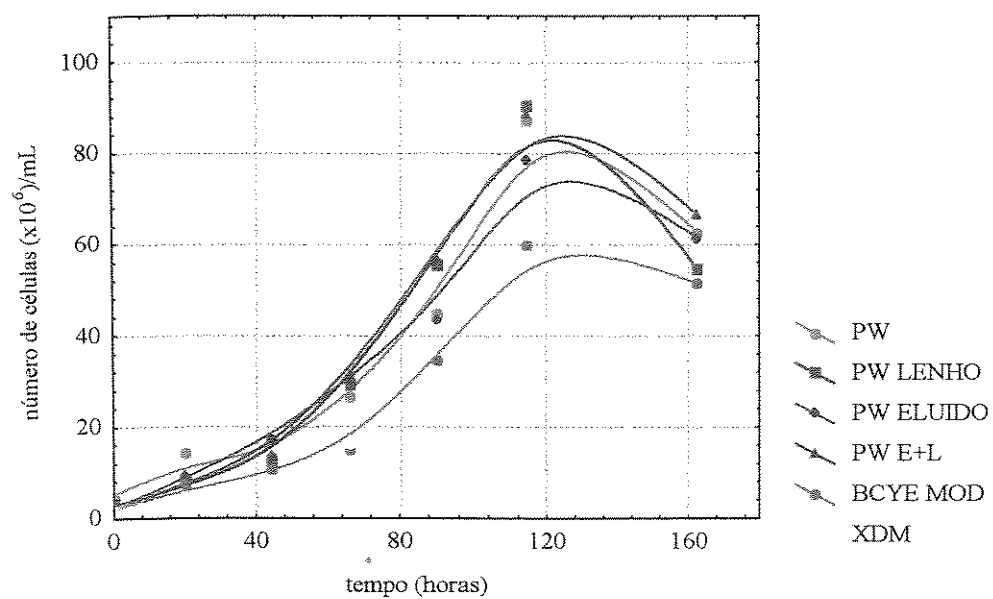


Figura 2- Curva de crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa* nos diferentes meios de cultura através de contagem de células em Câmara de Neubauer .

1.2. Curvas de Crescimento de *X. fastidiosa* em condições de adesão

Com a finalidade de monitorar o crescimento das bactérias aderidas às lâminas de lenho foi realizada uma segunda curva de crescimento, comparando separadamente as bactérias que crescem em suspensão no meio (S) com as que crescem nas lâminas do meio PW + lenho (L). Para isto foi extraído DNA das bactérias nas três condições (L, S e C) nos diferentes intervalos de tempo. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as concentrações de DNA extraídos nos diferentes tempos de crescimento da bactéria (dados não mostrados). Assim, a extração de DNA não foi uma técnica adequada para estimar a multiplicação das bactérias nas condições estudadas. Provavelmente, estes resultados podem ser atribuídos à falta de uniformidade na extração.

As estimativas do número de células em Câmara de Neubauer foram repetidas para os cultivos C e S (Fig.3). Contudo, houve modificações nos tempos avaliados, uma vez que, na primeira curva foram avaliadas até 180 horas de crescimento, enquanto na segunda, 360 horas. O padrão da curva foi semelhante, nos dois casos, exceção a fase "lag" que na segunda curva se apresentou menos pronunciada.

As unidades formadoras de colônias (UFC) também foram utilizadas como estimativa da multiplicação bacteriana para as três condições. Não foram detectadas diferenças significativas entre os cultivos S e C (Fig. 4), sendo que seus padrões apresentaram-se semelhantes. Para as bactérias aderidas às lâminas de lenho (L), o crescimento foi diferente dos demais, com tempos de crescimento diferenciados (Figura 6). O crescimento em L foi também monitorado em microscópio óptico (Fig. 6). Além disso, os cultivos foram monitorados sob condições de agitação a 120 rpm e estáticas. Foi observado, em microscópio óptico, que sob agitação as células têm menor taxa de aderência do que quando crescidas de forma estática.

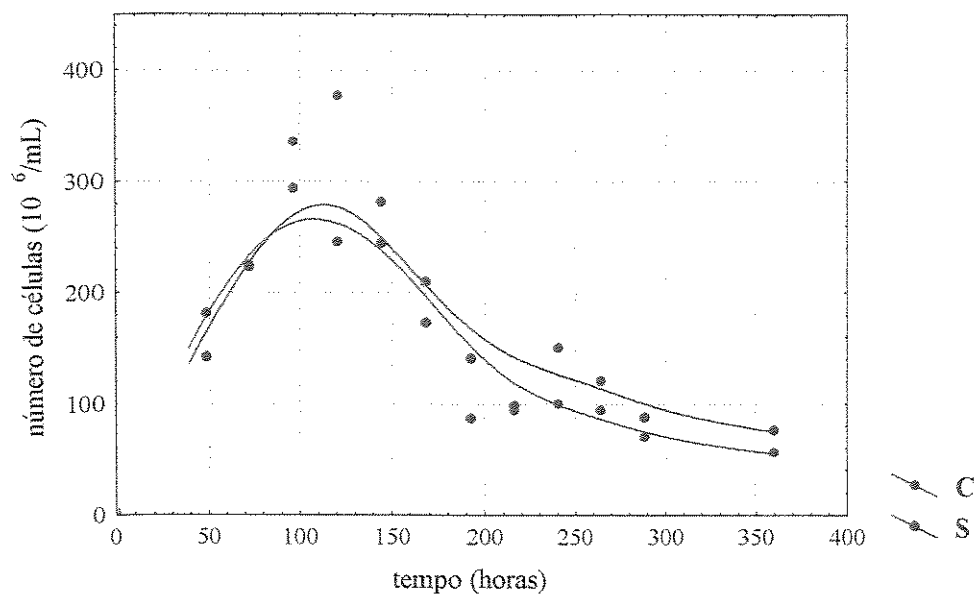


Figura 3- Curva de crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa* nos cultivos C e S determinada pela contagem de células em Câmara de Neubauer .

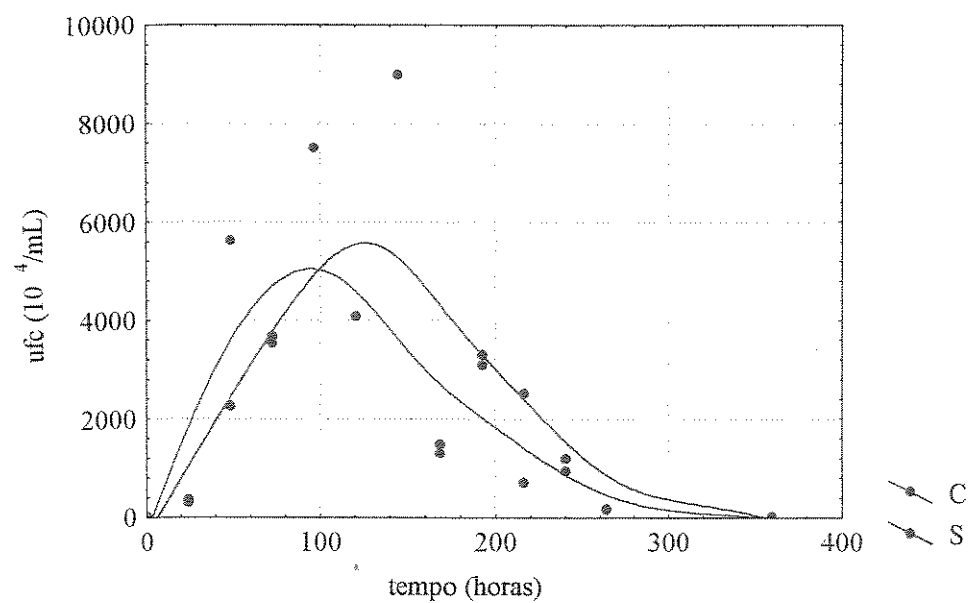


Figura 4- Curva de crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa* nos cultivos C e S através da estimativa das unidades formadoras de colônia .

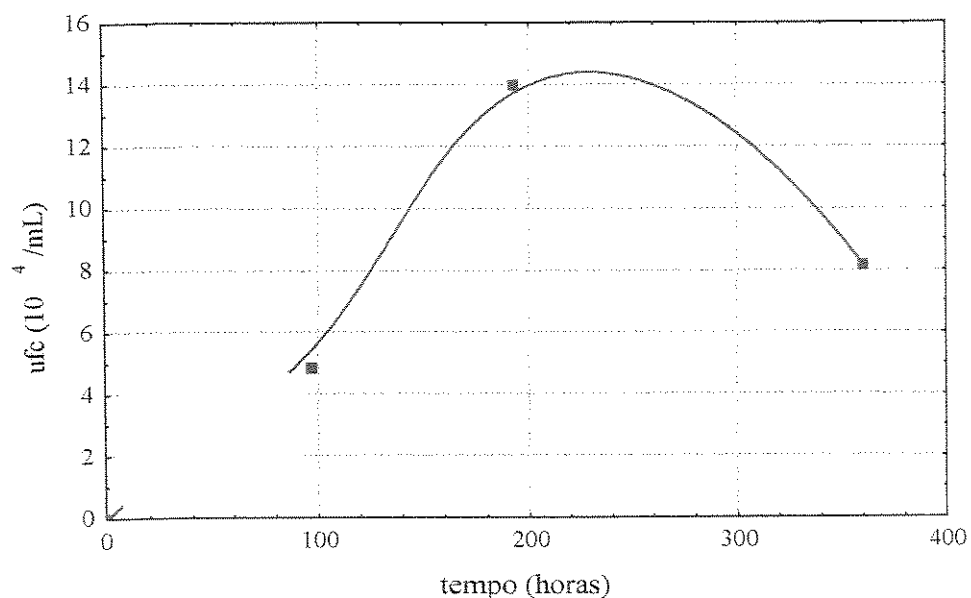


Figura 5- Curva de crescimento da bactéria *Xylella fastidiosa* aderida às lâminas de lenho (L) através da estimativa das unidades formadoras de colônia .

Tabela 2- Tempos de geração e morte de celular de *Xylella fastidiosa* nas condições controle(C), bactérias em suspensão em PW suplementado com lâminas de lenho (S) e bactérias aderidas às lâminas de lenho (L).

Condições	Tempo de geração (h)	Tempo de morte (h)
C	13,5	25,4
S	11,4	23,0
L	62,7	217,3

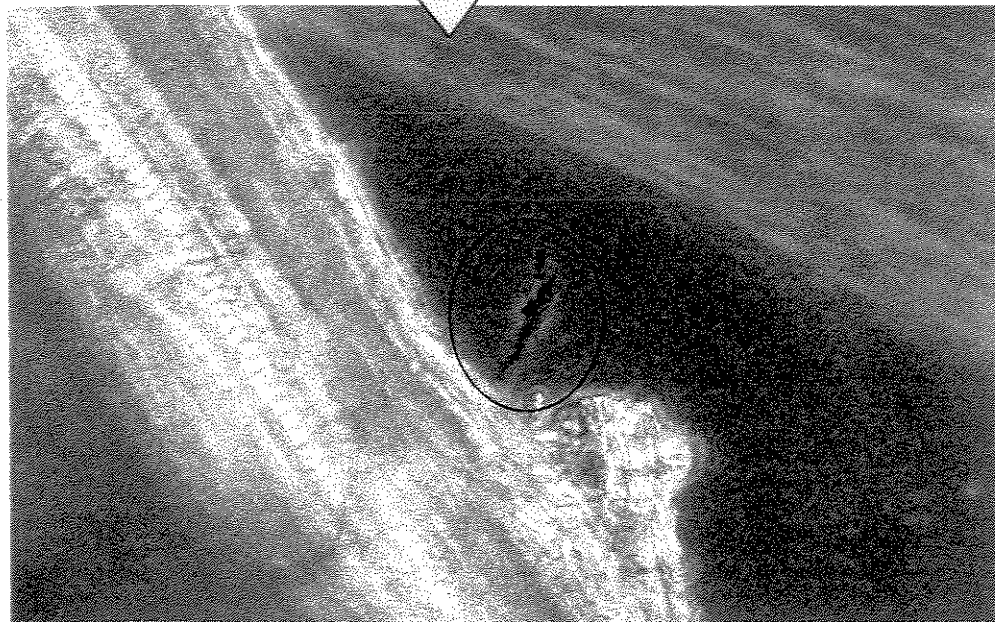
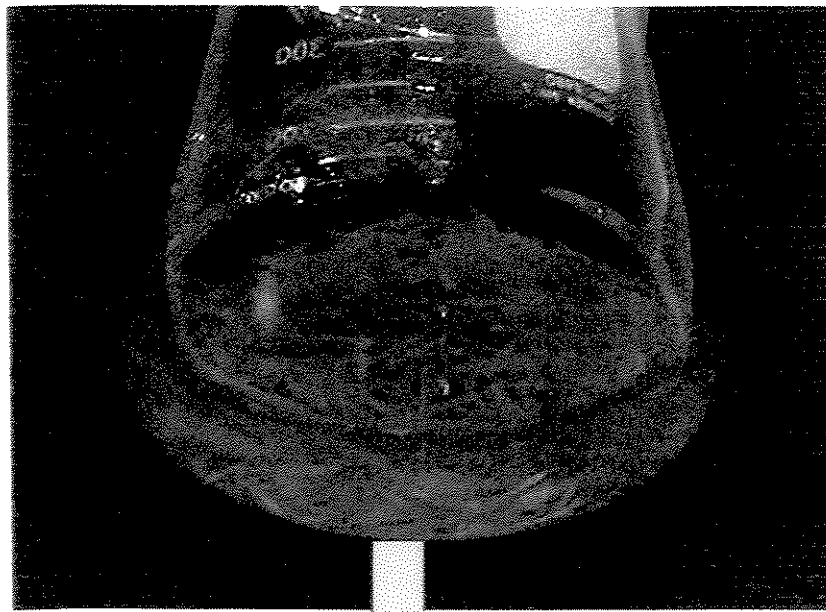


Figura 6- Aspecto das células bacterianas de *Xylella fastidiosa* aderida às lâminas de lenho, observadas em microscópio óptico.

Através da avaliação de UFC foram calculadas os tempos de geração e morte celular para as condições de cultivo C, S e L (Tabela 2). Os tempos de geração e morte celular de C e S foram similares, correspondendo ao padrão encontrado pelas curvas, de aproximadamente 12 h e 24h, respectivamente. Em L, tanto a taxa de multiplicação como a de morte celular foram muito baixas. Possivelmente, no hospedeiro, esta taxa de multiplicação também deve ser baixa, uma vez que os sintomas demoram vários meses para se expressarem.

Através da análise das curvas de crescimento de *X. fastidiosa*, foi possível identificar suas fases exponencial e de morte celular. A taxa de crescimento de populações bacterianas é um componente essencial da função microbiana (Brock *et al.*, 1970). Este crescimento é dependente de fatores ambientais, como nutrição e temperatura, e de fatores genéticos. Em estudos funcionais, especialmente em trabalhos de expressão gênica, a padronização do crescimento de populações bacterianas é fundamental, uma vez que variações de fatores ambientais podem alterar o crescimento desta população. Para este tipo de abordagem, é necessário a estimativa do maior número de células metabolicamente ativas, ou seja, em fase exponencial.

O isolamento de *X. fastidiosa* é trabalhoso e há necessidade de meios ricos em nutrientes e crescimento lento, daí a denominação de organismo fastidioso (Chagas *et al.*, 1992). As células apresentam parede celular ondulada e encontram-se embebidas em uma matriz densa composta por EPS (Chagas *et al.*, 1992), o que implica na formação de agregados, dificultando a mensuração da multiplicação celular, tornando menos precisas as de curvas de crescimento estabelecidas por métodos usuais de medida de crescimento de bactéria. Apesar disso, o efeito da temperatura sobre o crescimento já foi estabelecido para diferentes patovares de *X. fastidiosa*. (Feil & Purcell, 2001). Contudo, são poucos os trabalhos que efetivamente apresentam curvas de crescimento reprodutíveis, em função dos padrões de crescimento *in vitro* e do seu tempo de geração.

Neste trabalho, foram determinadas as diferentes fases de crescimento de *X. fastidiosa*. Em todos os meios de cultura utilizados nestes trabalho, a fase exponencial correspondeu ao intervalo de 72 a 120 horas, exceto para lenho, que foi de 120 a 210 horas. A caracterização e padronização do crescimento da bactéria *in vitro*, nos diferentes meios de cultura, incluindo a utilização de lâminas de lenho de laranjeira como modelo para superfície de adesão, podem auxiliar em estudos de expressão gênica de *X. fastidiosa*, permitindo uma melhor compreensão dos seus mecanismos de patogenicidade.

2. Enriquecimento de mRNA de *Xylella fastidiosa* para estudo de expressão gênica

2.1. Isolamento do RNA total e Enriquecimento do mRNA

O método de extração descrito por Rhodius apresentou RNA total com rendimento de cerca 100µg a partir de 250 mL de meio.

O RNA total foi hibridizado com a fita antisense de 16S/23S marcada com biotina, seguida de extração com streptavidina. Através da eletroforese em gel denaturante de agarose foi possível verificar que as bandas de rRNA presentes no RNA total foram eliminadas na preparação do RNA mensageiro (Fig. 7).

Apesar disto, a ausência das bandas de rRNA no gel denaturante também poderiam indicar a degradação da amostra. Assim, para verificar a integridade deste RNA mensageiro foram realizados amplificações dos genes *rpf* B, F e G. Como controle positivo foram utilizados dois cosmídeos, um com os genes *rpf* A e B inseridos, e outro com os *rpf* C, D, E, F e G. A amplificação ocorreu com sucesso entre as preparações de mRNA e do controle positivo. O *rpf* B tem o tamanho de 1,709 pb, *rpf* F 872 pb, *rpf* G 1,158 pb (Fig. 8). Foi observada amplificação apenas no RNA enriquecido e nenhuma no cDNA proveniente de RNA total. Tal fato pode ser explicado pela redução na quantidade

de transcritos de cDNA obtidos através da transcrição reversa de RNA mensageiro como consequência da grande quantidade de cDNA proveniente de rRNA, que poderiam influenciar nas etapas subseqüentes da amplificação.

2.2. Hibridização Subtrativa

Após a subtração foram identificadas bandas em gel de agarose 1,5% (Fig. 9) que foram purificadas e clonadas em pGEM-T. Foram escolhidos 288 clones das bibliotecas para sequenciamento. Destes clones, cerca de 90%, ainda apresentaram similaridade com rRNA e os que apresentaram homologia com ORFs do genoma da *X. fastidiosa* estão representados na tabela 3. Embora tenha sido comprovado o enriquecimento do mRNA, as porcentagens de moléculas de rRNA, presentes nesta amostra, ainda foram similares as encontradas em preparações de RNA total, sem purificação do mRNA.

Apesar disto, foram identificados quatro clones. Um deles apresentou similaridade com a ORF XFb0001 de *X. fastidiosa* que foi anotada como proteína de replicação na categoria VI.B (funções relacionadas a plasmídeo) e possui similaridade com uma proteína desconhecida do bacteriófago Pf3, que infecta *Pseudomonas aeruginosa*. Um outro clone, com similaridade com a ORF XF 2551, pertence a categoria VIII.B (proteínas hipotéticas) que se refere a ORFs que não apresentam similaridade com nenhum gene depositado no GenBank database. Esta ORF codifica uma proteína que parece estar localizada na membrana interna, de acordo com PSORT ("Prediction protein localization sites"). Uma das ORFs adjacentes (XF2550) tem similaridade ao gene *hecB* de *Erwinia chrysanthemi*, cujo produto está anotado na categoria de produção de toxinas e detoxificação (VII.C) e tem como função a ativação e secreção extracelular da hemolisina. A proteína HecB tem na porção N-terminal um peptídeo de sinalização e seqüência típica de proteína de membrana externa, formada por estruturas β -pregueadas e uma seqüência final de fenilalanina, com homologia típica a adesinas (Kim *et. al.*, 1998).



Figura 7- Enriquecimento de RNA mensageiro. 1a e 2a : RNA total, 1b e 2b: RNA mensageiro enriquecido.

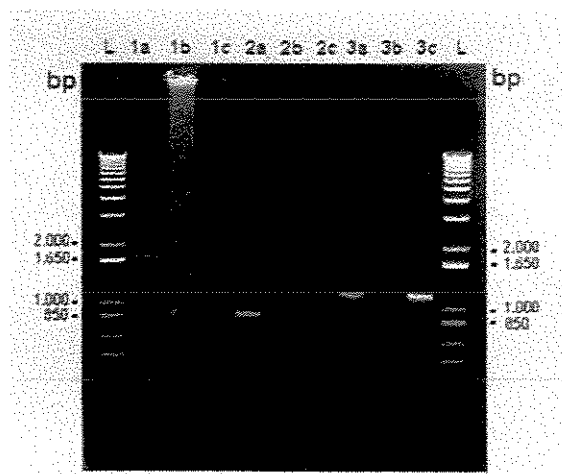


Figura 8- Amplificação dos genes *rpf*. L: ladder 1000bp, 1a: controle positivo do gene *rpf* B, 1b: cDNA proveniente de RNA total e amplificado com "primers" para *rpf* B, 1c: cDNA proveniente de mRNA enriquecido e amplificado com "primers" para *rpf* B. 2a: controle positivo do gene *rpf* F, 2b: cDNA proveniente de RNA total e amplificado com "primers" para *rpf* F, 2c: cDNA proveniente de mRNA enriquecido e amplificado com "primers" para *rpf* F. 3a: controle positivo do gene *rpf* G, 3b: cDNA proveniente de RNA total e amplificado com "primers" para *rpf* G, 3c: cDNA proveniente de mRNA enriquecido e amplificado com "primers" para *rpf* G

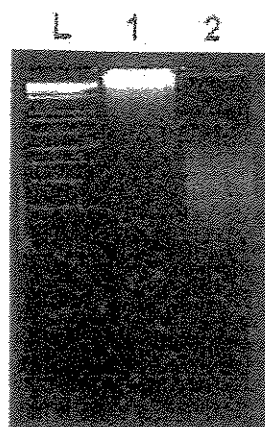


Figura 9- Hibridização subtrativa de bactérias crescidas em meio PW com lenho contra controle. L: ladder 1 kb; 1: não subtraído; 2: L-C.

Tabela 3- Sequências da biblioteca de cDNA que apresentam homologia com ORFs do genoma de *Xylella fastidiosa*.

Clone	Categoria Funcional	Gene	ORF	Descrição
1	Elementos genéticos móveis	-	XF b0001	Proteína de replicação
2	Proteínas hipotéticas	-	XF 2551	Proteína hipotética
3 e 4	Estrutura celular	<i>piY1</i>	XF 0478	Proteína similar a fimbria

Outros dois clones apresentaram homologia com a ORF XF 0478 com similaridade com o gene *piY1* de *Pseudomonas aeruginosa*, que codifica uma proteína de alto peso molecular, com C-terminal homólogo ao PilC2 de *Neisseria gonorrhoeae* que é um tipo de adesina envolvida na formação fimbrial, e localizada tanto nas membranas como nas frações externas da fimbria. Esta proteína parece envolvida na biogênese da fimbria tipo IV e a proteína PilY1 é composta por filamentos envolvidos na adesão para a colonização de superfícies no hospedeiro (Alm *et al.*, 1996).

O método descrito por Su & Sordillo (1998) para o enriquecimento de populações de mRNA foi empregado para a bactéria *X. fastidiosa*, com obtenção de sonda da fita antisense da região 16S/23S, com aproximadamente 5 kb e marcada com biotina. Como confirmação da integridade destes mRNA foi realizada amplificação dos genes *rps*, foi verificada a amplificação diferencial entre as moléculas de cDNA provenientes de mRNA enriquecido. Para estas amostras houve maior especificidade e maior concentração de fragmento amplificado, o que pode sugerir uma otimização pela menor competição de moléculas dada pela retirada do rRNA. Contudo, o sequenciamento de biblioteca de hibridização subtrativa mostrou cerca de 90% dos clones ainda corresponderam a rRNA. Embora tenham sido identificados três genes relacionados a condição em que a bactéria está aderida às lâminas de lenho.

Su & Sordillo (1998) verificaram a eficiência de marcação apenas por gel denaturante e a ausência das bandas ribossomais indicando a redução da quantidade de rRNA após o enriquecimento, porém outras técnicas de biologia molecular aplicada não foram testadas para a comprovação do enriquecimento. A purificação de populações de mRNA através de poliadenilação *in vitro* já foi realizada em *E. coli* (Amaro & Viajaya, 1997). A eficiência deste enriquecimento foi verificada em microarranjos, onde a expressão gênica global foi comparada entre hibridizações feitas com cDNA provenientes de RNA total e mRNA, tendo sido verificada uma intensidade de sinal apenas 1% maior

em amostras de mRNA do que RNA total (Wendisch *et al.*, 2001). Os autores concluíram que, embora o enriquecimento de mRNA não otimize a análise da expressão gênica global, o enriquecimento pode ter aplicações particulares em análises de associações simbióticas ou parasitárias de procariotos com eucariotos.

Em *Pseudomonas putida*, a poliadenilação do mRNA foi realizada para a utilização da técnica de hibridização subtrativa com sucesso, permitindo a identificação de cerca de 40 genes diferencialmente expressos na formação de biofilme (Sauer & Camper, 2001).

Da mesma forma, que existem resultados contraditórios para a purificação de mRNA por poliadenilação, estudos mais aprofundados deverão ser feitos para identificar quais as metodologias mais eficazes no emprego da sonda de 16S/23S para enriquecimento de mRNA de *X. fastidiosa* no estudos de expressão gênica. Contudo, como o objetivo deste trabalho foi a avaliação dos genes diferencialmente expressos em *X. fastidiosa* em condições de adesão (formação de biofilme) e planctônica, a utilização de outra metodologia, como os microarranjos, se faz necessária para a caracterização global deste processo.

3. Expressão gênica de *X. fastidiosa* em condições de adesão através de microarranjos

Após a hibridização, foram observadas diferenças qualitativas e quantitativas na avaliação dos genes expressos. Em cada lâmina, foram fixadas cerca de 2700 “spots” distribuídos em quatro quadrantes com três repetições, correspondendo a 2200 ORFs amplificadas a partir do Genoma de *X. fastidiosa*. Algumas ORFs maiores que 1Kb foram amplificadas por mais de um par de “primers” e distribuídas em pontos diferentes da lâmina. ORFs menores que 400 pares de bases não foram utilizadas para a lâmina. A decisão de não utilizar ORFs menores foi relacionada principalmente às dificuldades de amplificação e purificação de fragmentos pequenos e da localização destes no

cromossomo (próximas a regiões que flanqueiam ORFs maiores), associado ao fato de muitas dessas ORFs não apresentarem nenhuma função conhecida.

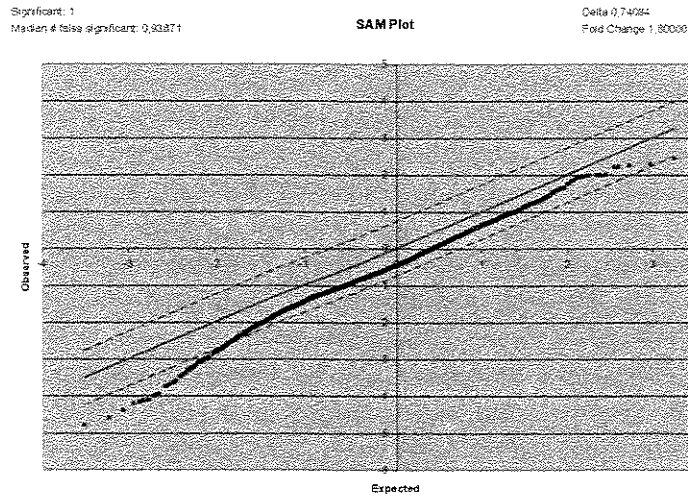
O nível de expressão gênica, indução ou repressão, foi representado pela razão da intensidade de fluorescência dos dois corantes na expressão diferencial dos genes para cada experimento. A partir das medidas de intensidade, foram calculadas as médias de todos os experimentos pelo teste SAM, e através destes valores foi determinada a intensidade dos dois corantes para cada ORF fixada na lâmina (Fig. 10 A e B). Apenas os valores das razões acima de 1.8 foram consideradas significativas para expressão gênica diferencial. Este teste evita a ocorrência de erros no valor da razão da expressão diferencial de algumas ORFs devido a eventos estocásticos.

O nível de expressão da maioria dos genes não foi alterada entre as condições de crescimento. No experimento C x S, a análise estatística considerou apenas um gene reprimido em S, que codifica uma proteína hipotética. Para as demais ORFs fixadas na lâmina não houveram diferenças significativas nos níveis de expressão gênica (Fig. 10 A). A ausência de genes diferencialmente expressos nestas condições pode ser atribuída a semelhança nesta etapa do crescimento, uma vez que em ambas *X. fastidiosa* encontra-se em fase planctônica. Desta forma, a presença das lâminas de lenho, em S, parece não alterar a expressão gênica. Apesar disto, considerando apenas os valores da razão da intensidade de marcação, sem análise estatística, foi encontrado um gene induzido em S, *tonB* (XF 2287), cujo produto está associado a uma proteína de membrana externa P6 (XF1896), que foi encontrada mais expressa por 2D-PAGE nesta mesma condição (ver adiante item 4.2.).

No experimento de C x L, conforme observado na Figura 10 B, aproximadamente 90% dos genes estão distribuídos entre 2 e -2 indicando que a maioria foi expressos nas duas condições. Aproximadamente, 216 genes foram reprimidos em L (8% das ORFs encontradas na lâmina), enquanto cerca de 70 genes foram induzidos (2,6%). A

distribuição dos genes diferencialmente expressos em C x L entre as categorias funcionais do genoma (www.aeg.ibi.ic.unicamp/xf) estão representados na tabela 4 na figura 11.

A



B

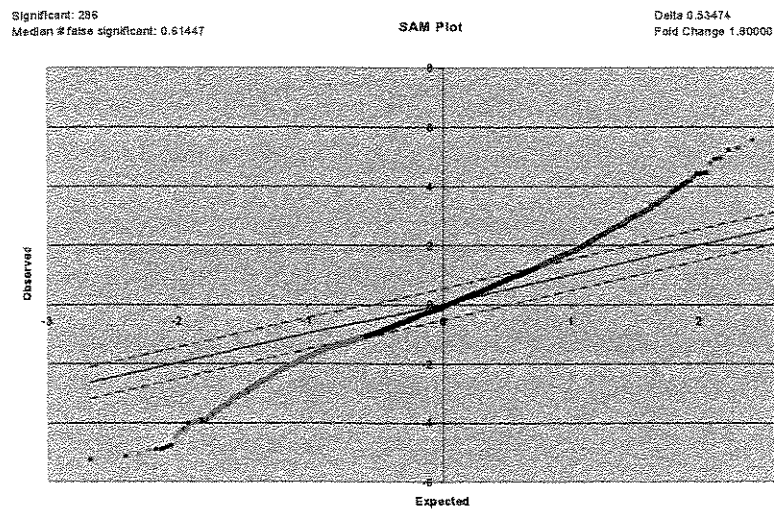


Figura 10- Identificação dos genes com alterações significativas nos níveis de expressão. Gráfico de dispersão das diferenças relativas observadas versus as diferenças relativas esperadas calculadas pelo SAM. As linhas pontilhadas indicam o nível considerado de 1.8 para indução ou repressão. Os genes de expressão diferencial significativa estão representado por pontos vermelhos, quando induzidos, e verdes quando reprimidos. A. C x S: $\Delta = 0.74$; B. C x L: $\Delta = 0.53$.

Figura 11- Distribuição dos genes diferencialmente expressos em *X. fastidiosa* nas condições C e L de acordo com a categoria funcional

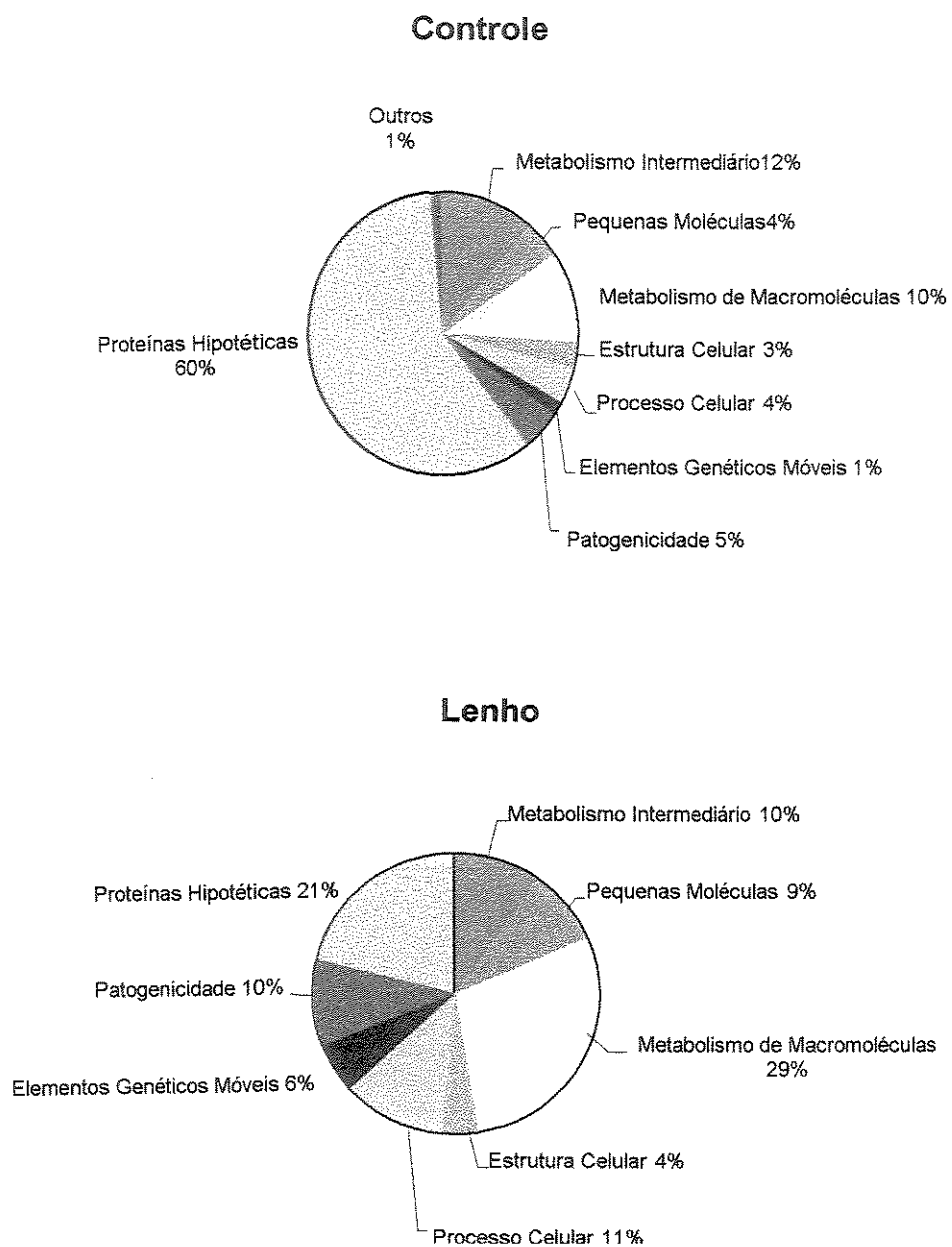


Tabela 4- Genes diferencialmente expressos em *X. fastidiosa* nas condições C e L de acordo com a categoria funcional

Categoria Funcional	C	L
I- Metabolismo intermediário	25	8
II- Biossíntese de pequenas moléculas	9	6
III- Metabolismo de macromoléculas	22	21
IV- Estrutura celular	6	3
V- Processos celulares	9	8
VI- Elementos genéticos móveis	3	3
VII- Patogenicidade, virulência e adaptação	12	7
VIII- Proteínas hipotéticas	126	13
IX- Outras	3	0

Tabela 5 – Razão da expressão gênica das categorias funcionais na condição de adesão de *Xylella fastidiosa* nas lâminas de lenho

Categoria Funcional	Gene	ORF	Descrição	Razão da Expressão Gênica
Metabolismo Intermediário	<i>algH</i>	XF2228	Regulador transcricional	- 1.86
Estrutura Celular	<i>prc/tsp</i>	XF1823	Protease terminal-específica	1.80
	<i>pilE</i>	XF0479	pili tipo IV	- 4.49
	<i>pilC</i>	XF2538	Proteína constitutiva da fimbria	- 4.17
	OPRO	XF0321	Precursor O porina	- 2.7
	<i>rfbB</i>	XF0611	dTDP-glicose 4-6 desidratase	- 6.67
	<i>pilY1</i>	XF0478	Proteína constitutiva da fimbria	2.83
		XF1791	Fimbrilina	1.84
Processos Celulares (transporte)	<i>ycfF</i>	XF1891	Proteína di-tripeptídeo do transporte de membrana ABC	1.87
	<i>pstA</i>	XF2143	Permease fosfato do transporte ABC	2.27
	<i>rfbD</i>	XF2567	Proteína permease do transporte ABC	2.10
	<i>rfbE</i>	XF2568	Proteína ligada ao ATP do transporte ABC	2.04
	DRA0349	XF2582	Proteína ligada ao ATP do transporte ABC	1.85
	<i>secD</i>	XF0225	Proteína de membrana de exportação de proteína	2.43
Patogenicidade, Virulência e Adaptação	<i>cvcA</i>	XF0263	Precursor colicina V	- 5.83
	<i>xrvA</i>	XF0749	Regulador de virulência	- 14.0
	<i>vapE</i>	XF2121	Proteína associada a virulência E	- 5.94
	<i>uspA1</i>	XF1516	Proteína de superfície de membrana externa	- 3.28
	<i>hsf</i>	XF1529	Proteína de superfície	- 4.27
	<i>gumM</i>	XF2360	Proteína GumM	- 2.45
	<i>ttg2C</i>	XF0419	Proteína de tolerância ao tolueno	2.05
	St3F7.11	XF1038	Peptídeo sintetase	1.91
	<i>tolC/mukA</i>	XF2586	Fator de exportação da membrana externa	2.26
	<i>tonB</i>	XF2287	Proteína TonB	1.81
	<i>acrA</i>	XF2093	Proteína precursora de resistência a drogas	2.01
	<i>acrF</i>	XF2094	Efluxo de multidrogas	1.89

*: Determinado pela análise estatística SAM

Apesar do maior número de genes expressos em C, cerca de 60% correspondem a proteínas hipotéticas, enquanto os demais genes estão distribuídos nas outras categorias de maneira mais uniforme. Em L, o maior número de ORFs está concentrado na categoria de metabolismo de macromoléculas e de proteínas hipotéticas, contudo há uma disposição mais uniforme entre as categorias. Os genes diferencialmente expressos relacionados com adesão estão representados na tabela 5, onde o valor da razão das intensidades está representado por sinal positivo, para os genes com expressão induzida em L, e pelo sinal negativo, para os genes com expressão reprimida. As funções destes genes estão descritas abaixo:

Metabolismo Intermediário: Apenas um gene desta categoria, relacionado ao processo de adesão, foi reprimido em L. Este gene, *algH* (XF2228), é um regulador transcricional na síntese de alginato, que é um tipo de EPS. AlgH parece ter função na regulação do sideróforo, sendo que o papel deste é o de ligação e transporte de ferro para dentro da célula em condições de limitações ambientais. Também parecem regular negativamente proteases extracelulares que são importantes fatores de virulência (Schlickman *et al.*, 1995).

Em relação aos genes de expressão induzida em L, nesta categoria, apenas uma protease terminal-específica, *prc*, foi mais expressa (XF1823). Esta proteína parece estar envolvida na clivagem de extremidade C-terminal não polar, importantes na proteção bacteriana contra agentes externos, como certos tipos de drogas e alguns tipos de estresse como térmico ou osmótico.

Estrutura Celular: Foram encontradas dois genes reprimidos que codificam pili, *pilE* e *pilC*. O gene *pilE* (XF0479) possui similaridade com o mesmo gene de *Pseudomonas aeruginosa*, onde está relacionado com a biogênese da pili através de uma sequência

líder de pré-pilina. E este mesmo gene, parece ser responsável pela hemaglutinação celular em duas espécies do gênero *Neisseria* (Scheuerpflug *et al.*, 1999). O gene *pilC* (XF2538) também possui alta similaridade com o de *P. aeruginosa*, e está envolvido na translocação da pili tipo IV (PilA), também importante para adesão célula a célula (Scheuerpflug *et al.*, 1999). Ainda com expressão reprimida foram identificados os genes *oprO*, que é um precursor O-porina, constituinte da membrana externa (XF0321) e *rfbB*, que codifica dTDP-glicose 4-6-desidratase (XF0611), necessária para síntese de lipopolissacarídeos de cadeias O (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf>).

Apenas duas fimbrias foram encontradas induzidas. O gene *pilY1* (XF0478) com similaridade com o gene *pilY1* de *Pseudomonas aeruginosa*, que codifica uma proteína de alto peso molecular, com C-terminal homólogo ao PilC2 de *Neisseria gonorrhoeae* que é um tipo de adesina envolvida na formação fimbrial, e está localizada tanto nas membranas como nas frações externas da fimbria. Esta proteína parece estar envolvida na biogênese da fimbria tipo IV e a proteína PilY1 que é composta por filamentos envolvidos na adesão para a colonização de superfícies no hospedeiro (Alm *et al.*, 1996). Além desta fimbria, também foi identificado o gene que codifica fimbrilina (XF1791) com similaridade apenas na porção N-terminal com a proteína de *Xanthomonas campestris*. Nesta bactéria, esta mesma extremidade possui homologia com outras fimbrilinas do tipo IV, que, além das funções na estrutura da fimbria e agregação celular, possuem identidade com proteínas extracelulares secretadas (Ojanen-Reuhs *et al.*, 1997).

Processos Celulares (Transporte): Foram encontrados cinco genes do sistema ABC de transporte induzidos em L (XF1891, XF2143, XF2567, XF2568, XF2582). Em *Agrobacterium tumefaciens*, através da clonagem de uma região do cromossomo que contém genes necessários para virulência e adesão, foram identificados quatro genes que codificam o sistema ABC de transporte, com habilidade de exportar alguma

substância em meio com células hospedeiras necessária para a adesão (Matthysse *et al.*, 1997). Em *Pseudomonas putida*, estes genes também foram encontrados mais expressos na adesão bacteriana a superfície abiótica quando comparadas com bactérias em fase planctônica (Sauer & Camper, 2001).

O gene *secD* (XF0225), também induzido em L, que codifica uma proteína integral de membrana, envolvida na exportação de outras proteínas, pertencente a um agrupamento de sete proteínas secretoras (SecA-F e SecY) do aparato de translocação.

Patogenicidade, Virulência e Adaptação: Foi encontrado um gene reprimido em L relacionado com toxicidade, *cvcA* (XF0263). Esta codifica um precursor da colicina V com função antimicrobiana, que age em *E. coli* como fator de competição contra outras estirpes. Também foram encontrados dois fatores de virulência, *xvrA* (XF0749) e *vapE* (XF2121) similares aos encontrados em *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* na regulação de virulência e em *Dichelobacter nodosus*, respectivamente. Dois genes que codificam proteínas de superfície de membrana foram encontrados com níveis de expressão reprimidos, *uspA1* (XF1516) e *hsf* (XF1529), ambas relacionadas com adesão celular. Ainda com expressão reprimida, o gene *gumM* (XF2360), que faz parte do agrupamento de síntese de EPS, tem atividade glicose transferase na formação de um intermediário da goma fastidiana (Silva *et al.*, 2001).

Com relação aos genes induzidos, nesta categoria, foi identificado um gene que codifica uma peptídeo sintetase (XF1038), St3F7.11, responsável pela biossíntese de peptídeos com ação antibiótica e dois genes *acrA* (XF2094) e *acrF* (XF2093) envolvidos na resistência e efluxo de drogas. Estes genes estão relacionados com proteção contra substâncias tóxicas produzidas pela planta e já foram identificados também com expressão diferencial em *Pseudomonas putida* em estudos de adesão em sementes de milho (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Também houve maior expressão do gene *tig2C*

(XF0419) que codifica uma proteína de tolerância ao tolueno e faz parte do operon do sistema de transporte ABC.

Ainda com níveis de expressão induzidos em L, foi encontrado um fator de exportação na membrana externa, codificado pelo gene *tolC*. A proteína codificada por *tolC* tem sequência sinal independente durante secreção extracelular, permitindo o transporte de vários solutos como drogas, metais pesados e proteínas. TolC também é importante para a expressão de outras proteínas de membrana, atuando com outros sistemas de transporte, incluindo o sistema ABC (www.aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf).

Finalizando, ainda com expressão induzida em L, foi encontrado o gene *tonB* (XF2287), que codifica um receptor de membrana que interage com proteínas de membrana externa (OMPs) através de diferentes sítios, auxiliando principalmente na transdução de energia para receptores de membrana externa (Higgs *et al.*, 2002).

Apesar do mecanismo de adesão bacteriana e o processo de formação de biofilme estar sendo bem caracterizado ultimamente em diversas espécies (van Loosdrecht *et al.*, 1990; Denny, 1995; Davey & O'Toole, 2000; O'Toole *et al.*, 2000; Watnick & Kolter, 2000 ;) pouco se sabe sobre a cascata de eventos que ocorre na adesão e o desenvolvimento do biofilme. Neste trabalho puderam ser identificados alguns genes que não tinham ainda sido relatados como envolvidos na adesão de *X. fastidiosa*.

A grande quantidade de genes com expressão induzida em L, envolvidos com o metabolismo intermediário e de macromoléculas, bem como a distribuição mais uniforme dos genes entre as diferentes categorias funcionais, poderiam estar indicando uma adaptação ao crescimento em uma nova superfície, que parece ser regulada por múltiplas vias que controlam a formação de biofilme num estágio inicial de estabelecimento da população bacteriana nesta superfície.

Além disso, durante o processo de formação de biofilme, parecem existir grupos heterogêneos de células exibindo diferentes atividades, onde certas subpopulações

destas células podem ter um padrão de expressão gênica que não é tão homogêneo quanto o das populações de vida livre (Whiteley *et al.*, 2001). Esta mesma característica já foi observada em estudos de expressão gênica em *Pseudomonas putida* na formação de biofilme (Whiteley *et al.*, 2001).

Apesar das bactérias cultivadas na condição C não estarem expostas a superfícies, como as lâminas de lenho de laranjeira, foram encontrados alguns genes envolvidos com adesão celular, como *uspA 1* e *hsf*, fato que pode ser atribuído a capacidade de *X. fastidiosa* formar agregados mesmo *in vitro*. As bactérias utilizadas, neste trabalho, estavam na 10ª repicagem após isolamento de plantas cítricas com sintomas. Monterio *et al.* 2001 verificaram que *X. fastidiosa* expressaram sintomas mais rápidos quando inoculadas em plantas de vinca após a 8ª repicagem do que em 51ª repicagens. Assim, considerando diferenças nos níveis de expressão, em L, estes genes podem ainda não estarem sendo expressos, uma vez que, o processo de adesão para formação de biofilme estão envolvidos nas etapas iniciais.

A adesão das células a uma superfície, possivelmente, biótica, em L, promoveu modificações fenotípicas, com alterações tanto de proteínas de metabolismo intermediários e componentes estruturais como proteínas de membrana e transporte. Grande parte destes genes já haviam sido descritos como necessários para as etapas iniciais de adesão tanto em superfícies bióticas como em abióticas (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Matthysse *et al.*, 1997; Sauer & Camper, 2001; DeFlau *et al.*, 1999; Otto *et al.*, 2001; Whiteley *et al.*, 2001).

Além da função nos processos iniciais de adesão, alguns genes induzidos em L também já foram identificados com papel direto na patogenicidade, indicando que o processo de adesão possivelmente está relacionado a patogenicidade. Os genes encontrados relacionados ao efluxo de droga (*acrA* e *acrF*) e *tol* C foram identificados como fazendo parte do mesmo operon em *E. coli*, importante na regulação do

crescimento em quimiostato (Rand *et al.*, 2002). Este operon também atua em conjunto ao sistema de transporte ABC, ambos importantes no transporte de antibióticos, fatores de virulência e proteção contra algumas toxinas produzidas pelo hospedeiro (Sharff *et al.*, 2001). O gene de resistência a tolueno também induzido em L, também faz parte do operon do sistema ABC de transporte. O gene *tonB* está envolvidos com sideróforo na absorção de ferro, considerado um importante mecanismo de patogenicidade (Franza *et al.*, 1999).

As avaliações dos níveis de expressão gênica deste trabalho foram feitas por microarranjos e hibridização subtrativa. Na biblioteca de hibridização subtrativa, apesar do enriquecimento do mRNA, 90% dos clones foram correspondentes a genes ribossomais. Os demais genes identificados por esta metodologia, XF0478, XFb0001 e XF2550, também foram encontrados nas análises de microarranjos. A utilização das lâminas de lenho de laranjeira pode ser considerada um modelo eficiente na simulação de adesão bacteriana *in vitro*. Este material já havia sido utilizado para *X. fastidiosa*, onde o processo de adesão foi monitorado por microscopia em diferentes estirpes com lâminas de caule de diferentes hospedeiros compatíveis (Marques *et al.*, 2002).

Neste trabalho, pudemos identificar a expressão de alguns genes envolvidos com os mecanismos iniciais de adesão, contudo este mesmo modelo pode ser utilizado para caracterização de outras fases deste processo. A avaliação das diferenças de expressão gênica, através da metodologia de microarranjos, permitiu uma visão global dos mecanismos iniciais de adesão, indicando que alguns destes genes também estão associados com patogenicidade. Desta forma, em estudos posteriores, a produção de mutantes e ensaios biológicos serão essenciais para caracterização destes mecanismos.

4. Eletroforese bidimensional de proteínas totais de *X. fastidiosa* em adesão

4.1. SDS-PAGE

Com a finalidade de quantificar e identificar o padrão de proteínas de *X. fastidiosa* nos diferentes meios de cultura foi efetuado um estudo do perfil de proteínas totais por eletroforese em SDS-PAGE (dados não mostrados). Os resultados obtidos demonstraram, nas diferentes condições de cultivo, um padrão idêntico de bandas, com peso molecular variando de 20 a 110 kDa.

Em amostras provenientes da condição em que a bactéria se adere ao lenho (L), foi verificada a presença de um contaminante na porção superior do gel de empacotamento. Na amostra apenas com as lâminas de caule, sem bactéria, não foram identificadas proteínas provenientes do tecido vegetal, no entanto o mesmo contaminante foi visualizado. Este contaminante, provavelmente, é algum componente da planta que acompanha o processo de purificação parcial das proteínas, mas que interfere com a eletroforese. Possivelmente, esse contaminante seja polissacarídeos de alto peso molecular, como amido e/ou fragmentos de parede com alto teor de celulose, hemicelulose e lignina.

Na tentativa de minimizar o efeito da contaminação na corrida eletroforética, a amostra C foi preparada da mesma forma que L, com acréscimo de lâminas de lenho de laranjeira, porém estas sem *X. fastidiosa* aderida. Estas amostras foram quantificadas e um gel de SDS-PAGE com concentração de 9% foi realizado para detecção de proteínas de alto peso molecular para as amostras C e L (dados não mostrados). Contudo, o padrão de bandas também foi idêntico em ambas. E ainda foi verificada a presença do contaminante no gel de empacotamento nas duas amostras.

Como o princípio de separação de proteínas por SDS-PAGE é baseado em peso molecular, proteínas com massa próximas poderão ocupar a mesma posição no gel, sendo mais difícil identificar diferenças entre amostras que sejam bastante semelhantes.

Possivelmente, por este motivo, não foram detectadas proteínas diferenciais por este método.

4.2. Mapas Padrões de Proteínas da Eletroforese Bidimensional de *X. fastidiosa*

Com o objetivo de identificar as proteínas diferencialmente expressas quando a bactéria cresce em condições favoráveis a adesão, como lâminas de lenho de laranjeira “Pêra”, foi realizado um mapa 2D. Nessa etapa, mais uma vez o contaminante da planta interferiu na focalização isoeletrica, impedindo assim a construção de mapas 2D para essas condições. Desse modo, foram comparadas apenas bactérias planctônicas crescidas em meio PW (C) e em meio PW com lâminas de lenho. Nesta última condição foram avaliadas somente bactérias em suspensão (S), ou seja, aquelas que não estavam aderidas ao lenho. Provavelmente nessa condição pode estar ocorrendo o início da atração à superfície, embora as células estejam ainda em fase planctônica. O tempo empregado para o cultivo foi escolhido segundo padronização por curva de crescimento. As bactérias foram cultivadas por volta de 96 horas, correspondendo à fase exponencial de crescimento.

A análise geral dos perfis obtidos mostra que o peso molecular das proteínas variou de 10 a 100 kDa, apresentando a maior parte delas pH entre 4.5 e 7.0 (Fig. 12 e 13). Alguns “spots” foram considerados, através de comparação com o mapa referência de *Xylella* em meio BCYE, como indicadores de proteólise (Smolka, comunicação pessoal). Desta forma, as amostras que apresentaram estes fragmentos de proteínas foram consideradas lisadas.

Os mapas padrões obtidos das amostras C e S foram comparados e os “spots” diferenciais selecionados. Apenas as proteínas presentes em uma condição e ausentes na outra foram identificadas. Tanto em C quanto em S, cinco “spots” foram considerados diferenciais, além disso nas duas condições uma proteína comum foi identificada.

4.3. Identificação das Proteínas Diferencialmente Expressas por Espectrometria de Massa

As proteínas, diferenciais foram cortadas do gel de 2D-PAGE e digeridas com tripsina. Os peptídeos gerados foram analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF e identificados por comparação ao banco de dados de seqüências (Tab. 6). Todas as proteínas com altas porcentagens de identidade com a massa molecular foram encontradas no MS-Fit. Através desta análise, puderam ser estimados os pI (ponto isoelétrico), massa molecular e a porcentagem de peptídeos digeridos que é semelhante ao encontrado pela digestão virtual (cobertura do padrão de digestão).

Tabela 6 – Identificação de proteínas por espectrometria de massa MALDI-TOF nas condições Controle e Lenho em Suspensão.

Número do proteína	Condição de cultivo	Categoria	ORF	pI	Massa Molecular (Da)	Cobertura (%)
1 e 2	C	VII.F	XF1516	7.17	98284.1	34
3	C	III.C.1	XF2579	5.78	32057	25
4	C	VII.C.	XF1530	6.08	22891.3	17
5	C	VII.C	XF2614	5.60	22643.6	21
6	C	VIII.B	XF0284	6.09	125562	44
7 e 8	C e S	III.C.3	XF0156	6.60	30767	31
9	S	III.C.3	XF0156*	6.60	30767	33
10	S	VIII.A	XF1840	6.37	25104.4	40
11	S	IV.B	XF1896	8.60	20431.1	24

* "spot" identificado sem porção N-terminal.

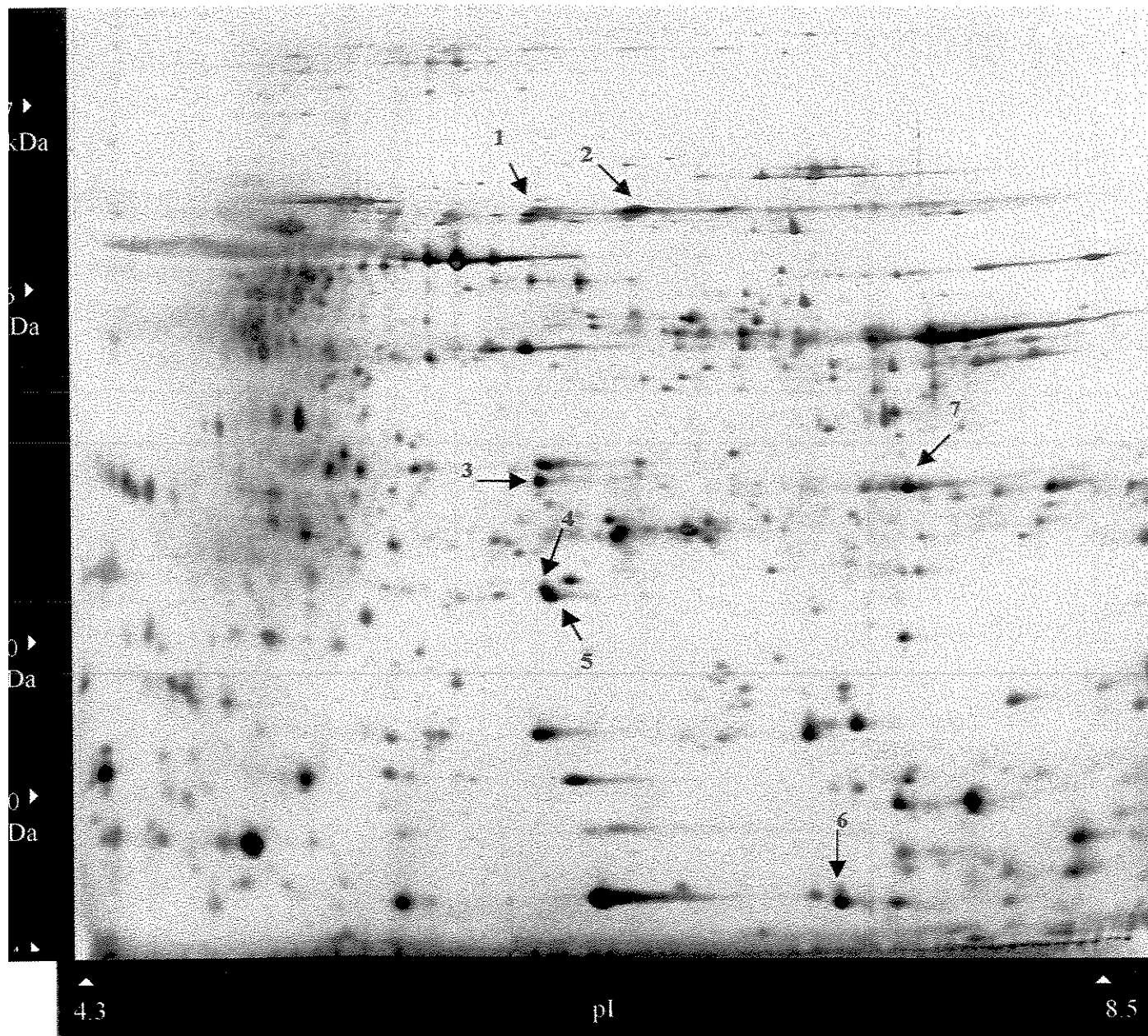


Figura 12- Mapa 2D-PAGE de proteínas totais de *Xylella fastidiosa* na condição controle. As setas indicam as proteínas com expressão diferencial

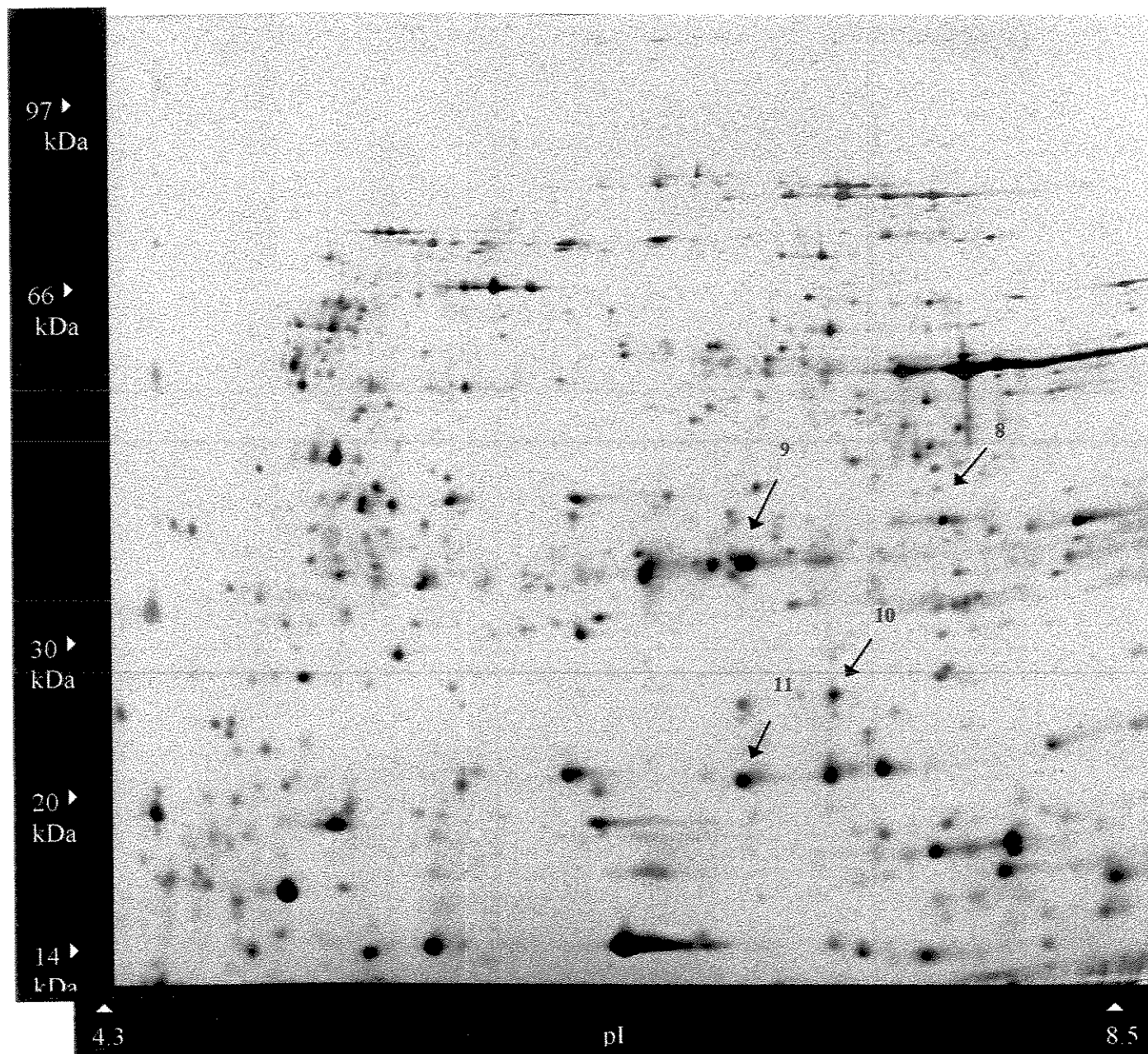


Figura 13- Mapa 2D-PAGE de proteínas totais de *Xylella fastidiosa* quando cultivadas em suspensão em meio contendo lâminas de lenho. As setas indicam as proteínas com expressão diferencial

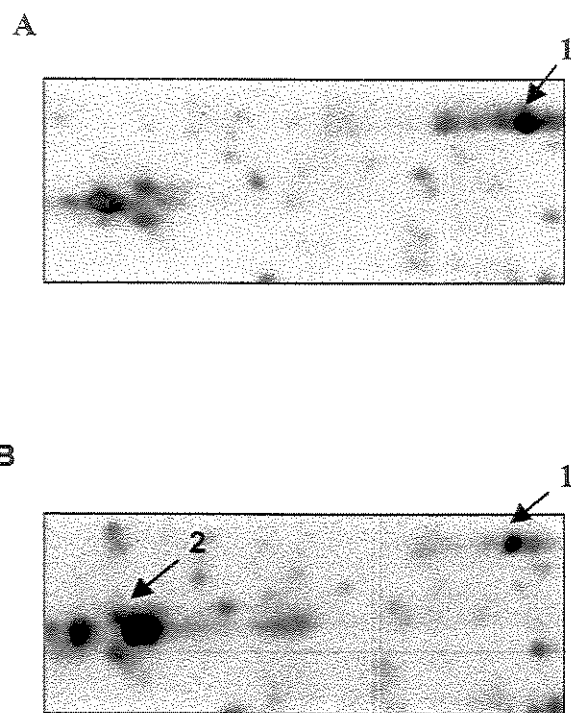


Figura 14- Mapa 2D-PAGE de *Xylella fastidiosa*. A: condição controle; B: condição de cultivo de bactérias em suspensão em meio com acréscimo de lâminas de lenho. A seta 1 indica cisteína protease (XF 0156); seta 2, presente apenas em B, indica cisteína protease (XF0156) com ausência de porção N-terminal.

As proteínas 1 e 2 em C foram detectadas como similares a ORF XF1516 anotada como uma proteína de superfície de membrana externa, produto do gene *uspA1*, de *Moraxella catarrhalis*, responsável pela aderência às células epiteliais humanas *in vitro* (Lanfontaine *et al.*, 2001). Contudo, buscas mais recentes no banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov), mostraram alta similaridade com proteínas de membrana de *Xanthomonas*, XadA e uma adesina de *E. coli*. Apesar da alta homologia com adesinas, esta proteína encontra-se mais expressa em C, condição onde as bactérias estão sendo cultivadas apenas em meio de cultura. Contudo, nesta condição, as células bacterianas aparecem mais agregadas, em microscopia óptica, que em S (dados não mostrados).

Além disso, proteínas envolvidas na síntese protéica, como o fator de alongação Ts (XF2579), na detoxificação celular, como a hidróperóxido redutase (XF1530) e superóxido dismutase (XF2614), e uma hipotética (XF0284) também foram encontradas na condição C.

Em S, dois dos "spots" selecionados não puderam ser identificados por espectrometria de massa. A proteína 10 foi correspondente a ORF XF1840, uma proteína hipotética, com alta probabilidade de ser uma lipoproteína localizada na membrana externa, através da análise de pSort. O "spot" 11 apresentou similaridade a ORF XF1896, anotada como uma proteína de membrana externa precursora da proteína P6 de *Haemophilus*. Novas pesquisas utilizando software blastp identificaram maiores similaridades com proteínas de membrana externa de *Xanthomonas*, além de lipoproteínas associadas a peptidoglicanas relacionadas com a integridade da membrana externa quando em interação com a proteína TonB em *Erwinia chrysanthemi*. As proteínas de membrana externa (OMP) tem sido sugeridas como envolvidas no princípio da adesão bacteriana associadas a diferentes superfícies (Otto *et al.*, 2001).

Uma cisteína protease (XF0156) foi encontradas tanto em C como em S (proteínas 7 e 8). Entretanto, um outro "spot" diferencial em S foi detectado como a mesma proteína,

porém sem a extremidade N-terminal (Figura 14). No genoma de *X. fastidiosa* esta proteína foi anotada como similar a uma protease de *Giardia intestinalis* (Protozoário). Contudo, novas pesquisas em bancos de dados, indicaram maiores similaridades com cis-protease de *Fusobacterium nucleatum*, causadora de doenças periodontais (Kapatral *et al.*, 2002).

Esta proteína pertence a família das papaínas que possui domínio conservado em uma região peptidase_C1. Apesar disto, pouco se sabe de sua função, ao contrário de cisteínas proteases pertencentes a outras famílias, como as encontradas nas bactérias patogênicas *Streptococcus virulence* e *Porphyromonas gingivalis* (Kagawava *et al.*, 2000 e Tokuda *et al.*, 1996). Nestes organismos, as proteínas do tipo cisteína protease são importantes fatores de virulência, especialmente na colonização do tecido hospedeiro. Em *P. gingivalis* ela também parece estar associada, de maneira indireta, na biogênese das fimbrias no início da adesão bacteriana ao tecido colonizado (Tokuda *et al.*, 1996). Em *X. fastidiosa*, ainda não existem relatos de que esta proteína tenha atuação na colonização de hospedeiro. Porém pode representar um alvo potencial para o estudo de patogenicidade nesta bactéria.

Os resultados obtidos com o mapa de eletroforese 2D indicaram que a detecção de proteínas diferenciais pode ser observada com relativa facilidade, principalmente, quando comparados com o perfil SDS-PAGE, onde não foram encontradas diferenças. Apenas cinco proteínas foram mais expressas quando expostas a superfícies de adesão, sendo que duas delas não puderam ser identificadas por espectrometria de massa. Esta metodologia, portanto, permite a detecção de proteínas reprimidas ou que apresentem alterações no nível de expressão, uma vez que no controle também puderam ser identificadas cinco proteínas, reprimidas nas bactérias em suspensão no meio suplementado com as lâminas de caule.

O número reduzido de proteínas diferenciais em ambas as condições de cultivo pode ser atribuído a semelhança entre as amostras, uma vez que em ambas bactérias estão em vida livre (planctônica). Nas bactérias em suspensão no meio suplementado com as lâminas de caule, a presença da superfície de adesão pode levar a indução da expressão de algumas proteínas, uma vez que no início da adesão a atração pela superfície a ser colonizada parece ser um processo reversível tanto para as células já aderidas, quanto para as planctônicas. Além disso, outros fatores inerentes à própria metodologia, como limitação para identificação de proteínas de alto peso molecular, ou proteínas muito básicas ou ácidas também podem ser atribuídos para o reduzido número de proteínas identificadas.

Através da expressão gênica, por análises de microarranjos e hibridização subtrativa, puderam ser identificados genes envolvidos com as primeiras etapas do processo de adesão. Conforme discutido anteriormente, foi encontrado um gene induzido em S, *tonB* (XF 2287), cujo produto está associado a uma proteína de membrana externa P6 (XF1896), que foi encontrada mais expressa por 2D-PAGE em S, considerando apenas os valores da razão da intensidade de marcação, sem análise estatística.

A cisteína protease, possível fator de virulência e regulador na biogênese da fimbria, foi encontrada nas condições C e S por 2D-PAGE. Porém uma forma desta proteína foi sem a porção N-terminal (considerada forma ativa) foi identificada por 2D-PAGE com expressão diferencial em S. O gene que codifica esta proteína não mostrou expressão diferencial nos experimentos de microarranjos, uma vez que este gene não estava presente na lâmina.

Embora os experimentos C x S de microarranjos só tenham identificado uma proteína hipotética, através de 2D-PAGE outras proteínas diferencialmente expressas nestas condições puderam ter sido encontradas. Da mesma forma, não foi possível a realização dos mapas 2D da amostra de bactérias aderidas às lâminas de lenho (L),

impedindo a identificação das proteínas diferencialmente expressas, porém, através dos microarranjos, estes genes diferencialmente expressos puderam ser encontrados. Apesar disto, nas amostras controle, tanto por 2D-PAGE como por microarranjos, foi identificada a proteína UspA1.

Com relação às bactérias aderidas nas lâminas de lenho (L), teste com precipitações diferenciais poderão ser realizadas para eliminar a contaminação do material vegetal, uma vez que este parece ser uma superfície adequada para adesão de *X. fastidiosa in vitro* (Marques *et. al.*, 2002) em estudos de expressão. Apesar das limitações, os resultados de proteoma indicaram que esta metodologia pode revelar genes que de outra forma não poderiam ser analisados, auxiliando inclusive em trabalhos de anotação.

Conclusões Gerais

O processo de formação de biofilme bacteriano inicia-se com a interação de células planctônicas em uma superfície de adesão. Para caracterização das alterações fenotípicas destas células tem sido utilizadas técnicas de microscopia e avaliação da expressão gênica diferencial através da utilização de diversas superfícies, tanto bióticas como abióticas. Neste trabalho, lâminas de lenho de laranjeira foram utilizadas como modelo para o estudo de expressão gênica durante as etapas iniciais de adesão em *Xylella fastidiosa*.

Nessa abordagem de estudo funcional, a padronização do crescimento de populações bacterianas foi fundamental, pois variações de fatores ambientais podem alterar tanto a expressão de genes como a taxa de crescimento destas populações. Assim, para este trabalho, foram estabelecidas curvas de crescimento, sendo estimadas as fases exponenciais, ou seja, o maior número de células metabolicamente ativas, para cada condição.

A identificação de genes diferencialmente expressos tem sido realizada por métodos utilizando RNA total ou mRNA, sendo que essa última aumenta consideravelmente a especificidade da detecção. Assim, neste trabalho foi desenvolvido um protocolo de enriquecimento de populações de mRNA através da exclusão do rRNA por meio de uma sonda da fita antisense de rRNA. Apesar do enriquecimento ter sido visualizado em gel denaturante, a obtenção de mRNA purificado não foi eficiente na aplicação de técnicas de expressão gênica diferencial de hibridização subtrativa, pois ainda cerca de 90% dos genes identificados foram correspondentes a rRNA. Contudo, através da hibridização subtrativa foram encontrados três genes mais expressos na condição em que as bactérias estavam aderidas ao lenho, sendo estes posteriormente identificados nos microarranjos. Apesar das limitações da técnica, onde apenas os

transcritos mais abundantes foram identificados, esta metodologia pode ser uma alternativa para estudo de expressão diferencial.

Também para a identificação de genes diferencialmente expressos foi utilizada a técnica de microarranjos, que permite uma abordagem mais global da expressão pela grande quantidade de genes fixados nas lâminas, além de maior sensibilidade da detecção dos níveis de expressão. Na condição em que as bactérias estavam suspensas em meio contendo lâminas de lenho, não foram encontrados diferenças significativas na expressão quando comparadas com controle

Em contrapartida, na população de bactérias aderidas às lâminas de lenho, foram identificados genes envolvidos com a estrutura celular (como fimbria e pili), sistema de transporte ABC, relacionados com secreção, resistência e fitotoxinas entre outros já identificados em outras espécies bacterianas em estágios iniciais de adesão, mas ainda não encontrados em *X. fastidiosa*. No controle, também foram identificadas algumas adesinas, pili e proteínas de membrana, indicando que embora, nesta condição não haja acréscimo de superfícies de adesão, estes genes podem estar envolvidos com a agregação entre as células de *X. fastidiosa*.

A detecção de proteínas diferencialmente expressas foi realizada pelas metodologias de 2D-PAGE e de espectrometria de massa. Ao contrário do encontrado na análise de microarranjos, não foi possível a identificação das proteínas mais expressas nas bactérias aderidas às lâminas de lenho pela presença de um contaminante proveniente das lâminas de lenho que impediram a focalização isoelétrica da amostra. Outras metodologias de extração diferencial de proteínas poderão ser realizadas para obtenção do mapa 2D desta condição. Contudo, puderam ser detectadas proteínas diferencialmente expressas na condição em que as bactérias foram cultivadas em suspensão no meio suplementado com lenho. Estes resultados podem indicar que as técnicas de proteoma podem revelar genes que de outra forma não poderiam ser

avaliados. Para as bactérias em suspensão no meio com lâminas de lenho, foram encontradas, além de uma proteína de membrana, uma cisteína protease com modificação na porção N-terminal, que em outros organismos está relacionada no processo de adesão e que até então não havia sido relatada como envolvida neste processo para *X. fastidiosa*. Como nos experimentos de microarranjos, em 2D-PAGE, também foi identificada uma adesina, possivelmente, associada a agregação celular.

Os resultados indicaram novos genes e proteínas, possivelmente, envolvidas no processo inicial de adesão de *X. fastidiosa*. Apesar disto, o processo global da adesão e formação de biofilme ainda é pouco conhecido. Assim, o estabelecimento do modelo para o estudo de adesão e as metodologias para avaliação da expressão gênica podem auxiliar na análise das demais etapas deste processo, permitindo um melhor entendimento dos mecanismos de adesão, formação de biofilme e, conseqüentemente, patogenicidade desta bactéria.

Referências Bibliográficas

- Alms, R.A.; Halliman, J.P.; Watson, A.A.; Mattick, J.S. (1996). Fimbrial biogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa*: *piW* and *piX* increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and *piY1* encodes a gonococcal PilC homologue. **Mol. Microbiol.** 22(1):161-73.
- Amara, R.R.; Vijaya, S. (1997) Specific polyadenylation and purification of total messenger RNA from *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.** 25:3465-3470.
- Amaro, A.A.; Vicente, M.C.M.; Baptistella, C.S.L.(2001). Citricultura paulista: tecnologia e mão de obra. **Laranja**, 22(1):1-37.
- Beretta, M.J.G.; Lee, R.F.; Barthe, G.A.; Thomé Neto, J.; Derick, K.S.; Davis, C.L. (1993). Citrus variegated chlorosis: detection of *Xylella fastidiosa* in symptomless trees. **Proceedings of the XII International Organization of Citrus Virologists (IOCV)**:306-310.
- Brazma, A.; Vilo, J. (2000). Gene expression data analysis. **FEBS Lett.** 480:17-24.
- Brock, T.D.; Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. (1984). Growth and its control. In: **Biology of Microorganisms**, 7th ed., 909p.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, 8:93-95.
- Celis, J.E.; Kruhoffer, M.; Gromova, I.; Frederiksen, C.; Ostergaard, M.; Thykjaer, T.; Gromov, P.; Yu, J.; Páslidóttir, H.; Magnusson, N.; Orntoft, T. (2000). Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. **FEBS Letters**, 480:2-17.
- Chagas, C.M.; Rosseti, V.; Beretta, M.J.G. (1992). Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. **J. Phytopath.**, 134:306-312.

- Chang, C.J.; Garnier, M.; Zreik, L.; Rossetti, V.; Bové, M. (1993). Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. **Curr. Microbiol.**, 27:137-142.
- Coletta Filho, H.D.; Souza, A.A.; Machado, M.A. (2001). *Xylella fastidiosa*: um patógeno no xilema. In: Melo, I.S.; Valadares-Inglis, M.C.; Nass, L.L.; Valois, A.C.C. **Recursos genéticos e melhoramento**.
- Coote, J.G. (1992). Structural and functional relationships among RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, 8 (2):137-161.
- Coplin, D.L.; Cook, D. (1990). Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 5:271-279.
- Costerton, J.W. (2001). Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. **Trends Microbiol.**, 9:50-52.
- Costerton, J.W.; Lewandowski, Z.; De Beer, D.; Caldwell, D.; Korber, D.; James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. **J. Bacteriol.**, 176(8):2173-2142
- Davey, M.E.; O'Toole, G.A. (2000). Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 64(4):847-867.
- Davis, M.J.; Purcell, A.H.; Thomson, S.V. (1981). Isolation media for the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, 73(11):1510-1515.
- Denny, T.P. (1995). Involvement of bacterial polysaccharides in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 33:173-197.
- De Flaun, M.F.; Oppenheimer, S.R.; Streger, S.; Condee, C.W.; Fletcher, M. (1990). Alteration in adhesion, transport, and membrane characteristics in an adhesion-deficient pseudomonad. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65(2):759-765.
- Diatchenko, L.; Lau, Y-F.C.; Campbell, A.P.; Chenchik, A.; Moqadam, F.; Huang, B.; Lukyanov, S.; Gurskaya, N.; Sverdlov, E.; Siebert, P.D. (1996). Suppression

- subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93:6025-6030.
- Donadio, L. C.; Moreira, C.S. (1997). **Clorose variegada dos citros**. 1ª ed., Fundecitrus, Bebedouro, SP, 162p.
- Dunigan, D.D. (1989). Preparation of genomic DNA from bacteria. In: **Current Protocols in Molecular Biology**, p.241-242.
- Espinosa-Urgel, M.; Salido, A.; Ramos, J.-L. (2000). Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. **J. Bacteriol.**, 182(9):2363-2369.
- Estat - Sistema para análises estatísticas-versão 2.0, UNESP, FCAV, Jaboticabal, Polo Computacional/ Departamento de Ciências Exatas.
- Feil, H.; Purcell, A.H. (2001). Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* *in vitro* and in potted grapevines. **Plant Dis.**, 85(12):1230-1234.
- Fernandez, L. A.; Berenguer, J. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, 24:21-44.
- Fields, S. (2001). Proteomics in genomeland. **Science**, 291(5507): 1221-4.
- Franza, T.; Sauvage, C.; Expert, D. (1999). Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the fur repressor protein. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 12(2):119-128.
- Geme, J.W. (1996). Molecular determinants of the interaction between *Haemophilus influenzae* and human cells. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 154:192-196.
- Gygi, S.P.; Corthals, G.L.; Zhang, Y.; Rochon, Y.; Aebersold, R. (2000). Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis based proteome analysis technology. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97(17):9390-5.
- Gottwald, T.R.; Gidtti, F.B.; Santos, J.M.; Carvalho, A.C. (1993). Preliminary spatial and temporal analysis of citrus variegated chlorosis in Brazil. **Proceedings of the XII International Organization of Citrus Virologists (IOCV)**.

- Hartung, J.S.; Beretta, M.J.G.; Brilansky, R.H.; Spisso, J.; Lee, R.F. (1994). Citrus variegated chlorosis bacterium: axenic culture, pathogenicity, and serological relationships with other strains of *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, 84:591-597.
- Hertzberg, M.; Sievertzon, M.; Aspeborg, H.; Nilsson, P.; Sandberg, G.; Lundeberg, J. (2001). cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using a cDNA tag target amplification protocols. **Plant J.**, 25(5):585-591.
- Hill, B.L.; Purcell, A.H. (1995). Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. **Phytopathology**, 85:1368-72.
- Hopkins, D.L. & Mollenhauer, H.H. (1973). Rickettsia-like bacterium associated with Pierce's disease of grapes. **Science**, 179:298-300.
- Hopkins, D.L.; Adlerz, W.C. (1988). Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. **Plant Dis.**, 72:429-431.
- Hopkins, D.L. (1989). *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 27:271-290.
- Hopkins DL. (1995). *Xylella fastidiosa*. In: **Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical, genetic and molecular basis**. Vol I - Prokaryotes. Singh US, Singh RP, Kohmoto K eds. Elsevier Science Ltda. Great Britain. pp185-197.
- Kagawa, T.F.; Cooney, J.C.; Baker, H.M.; McSweeney, S.; Liu, M.; Gubba, S.; Musser, J.M.; Baker, E.N. (2000). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97(5):2235-2240.
- Kapatral et al. (2002). Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. **J. Bacteriol.**, 184(7):2005-2018.
- Katzen, F.; Ferreira, D.U.; Oddo, C.G.; Ielmini, M.V.; Becker, A.; Puhler, A.; Ielpi, I. (1998). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutant: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **J. Bacteriol.**, 180:134-137

- Kim, J.F.; Ham, J.H.; Bauer, D.W.; Collmer, A.; Beer, S.V. (1998). The *hprC* and *hprN* operons of *Erwinia chrysanthemii* EC16 are flanked by *plcA* and homologs of hemolysin/transporter genes. **Mol. Plant Microbe Interact.**, 11(6):563-567.
- Lanfontaine, E.R.; Wagner, N.J.; Hansen, E.J. (2001). Expression of the *Moraxella catarrhalis* UspA1 protein undergoes phase variation and is regulated at the transcriptional level. **J. Bacteriol.**, 183(5):1540-51.
- Leigh, J.A.; Coplin, D.L. (1992). Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. **Annu. Rev. Microbiol.**, 46:307-46.
- Leite, B.; Pascholati, S.F.; Kitajima, E.W.; Ishida, M.L. (2001). Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **RAPP**, 9:119-147.
- Liang, P.; Pardee, A.B. (1992). Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. **Science**, 257:967 - 971.
- Lopes, A.S.; Roberto, G.P.; França, S.C. (1999). Hospedeiros alternativos de *Xylella fastidiosa* dos citros. **Fitopatol. Bras.**, 24(supl.):250.
- Mathysse, A.G.; Yarnall, H.A.; Young, N. (1996). Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. **J. Bacteriol.**, 178(17):5302-5308.
- Marques, L.L.R.; Ceri, H.; Manfio, G.P.; Reid, D.M.; Olson, M.E. (2002). Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* *in vitro*. **Plant Dis.**, 86(6):633-638.
- Metha, A.; Rosato, Y.B. (2001). Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains for different hosts, based on 16S rDNA and 16S-23S intergenic spacer sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 51:311-318.
- Missanvage, G.V.; Thompson, C.M.; Hopkins, D.L.; Leite, R.M.V.B.C.; Stall, R.E. (1994). Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. **Phytopathology**, 84:446-461.

- Monteiro, P.B.; Renaudin, J.; Jagoueix-Eveillard, S.; Ayres, A.J.; Garnier, M.; Bové, J.M. (2001). *Catharanthus roseus*, an experimental host plant for the citrus strain of *Xylella fastidiosa*. **Plant Dis.**, 85 (3):246-251.
- O'Farrel, P.H. (1975). High-resolution separation two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, 250:4007-4021
- Ojanen-Reuhs, T.; Kalkkinen, N.; Westerlund-Wikström, B.; vanDoorn, J.; Haahtela, K.; Nurmiaho-Lassila, E.-L.; Wengelnik, K.; Bonas, U.; Korhonen, T.K. (1997). Characterization of *fimA* gene encoding bundle-forming fimbriae of plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. **J. Bacteriol.**, 179(4):1280-1290.
- O'Toole, G.; Kaplan, H.B.; Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. **Annu. Rev. Microbiol.**, 54:49-79.
- Otto, K; Norbeck, J.; Larsson, T.; Karlsson, K.-A.; Hermansson, M. (2001). Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. **J. Bacteriol.**, 183(8):2445-2453.
- Pandley, A.; Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, 405:837-846.
- Pooler, M.R.; Hartung, J.S., (1995a) Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Curr. Microbiol.**, 31:377-381.
- Pooler, M.R.; Hartung, J.S, (1995b). Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. **Curr. Microbiol.**, 31:134-137.
- Purcell, A.H.; Hopkins, D.L. (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.**, 34:131-151.
- Raju, B.C.; Wells, J.M.; Nyland, G.; Briansky, R.H.; Lowe, S.K. (1982). Plum leaf scald isolation, culture, and pathogenicity of the causal agent. **Phytopathology**, 72:1460-1466.

- Rand, J.D.; Danby, S.G.; Greenway, D.L.; England, R.R. (2002). Increased expression of the multidrug efflux genes *acrAB* occurs during slow growth of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 207(1):91-5
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sauer, K.; Camper, A.K. (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. **J. Bacteriol.**, 183(22):6579-6589.
- Schlichtman, D.; Kubo, M.; Shankar, S.; Chakrabarty, A.M. (1995). Regulation of nucleoside diphosphate kinase and secreted virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: roles of *algR2* and *algH*. **J. Bacteriol.**, 177(9):2469-2474.
- Scheuerpflug, I.; Rudel, T.; Ryll, R.; Pandit, J., Meyer, T. (1999). Roles of PilC and Pil E proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. **Infect. Immun.**, 67(2):834-843.
- Sharff, A.; Fanutti, C.; Calladine, C.; Luisi, B. (2001). The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. **Eur. J. Biochem.**, 268(19):5011-26.
- Silva, F.R.; Vettore, A.L.; Kemper, E.L.; Leite, A.; Arruda, P. (2001). Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibility involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Lett.**, 203:165-171.
- Simpson A.J.G. *et al.* (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, 406(13):151-159.
- Smolka, M.A.; Martins, D.; Winck, F.V.; Santoro, C.E.; Castellari, R.R.; Ferrari, F.; Brum, I.J.; Galembeck, E.; Coletta-Filho, H.D.; Machado, M.A.; Marangoni, S.; Novello, J.C. (2001). Proteome Analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major

cellular and extracellular proteins and peculiar codon bias distribution. I **Simpósio do Genoma Funcional de *Xylella fastidiosa***, p.29, Serra Negra, S.P.

Souza, A.A.; Takita, M.A.; Kuramae-Izioka, E.E.; Caldana, C.; Yanai, G.M.; Muto, N.H.; Oliveira, R. C.; Coletta Filho, H.D.; Nunes, L.R.; Machado, M.A. (2001). Avaliação de genes diferencialmente expressos em *Xylella fastidiosa* através da análise de microarray. **Fitopatol. Bras.**, 26:296-297.

StatSoft, Inc. (1995). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., Tulsa, OK.

Su, C.; Sordillo, L.M. (1998). A simple method to enrich mRNA from total prokaryotic RNA. **Mol. Biotechnol.**, 10:83-85.

Tahara, S.T.; Rosato, Y.B. (2000). Expressão diferencial de proteínas e mRNA na interação de *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae* com hospedeiro compatível. Tese de dissertação de doutorado apresentada pelo Departamento Genética e Evolução da Unicamp, 99p.

Tokuda, M.; Duncan, M.; Cho, M.-L.; Kuramitsu, H.K. (1996). Role of *Porphyromonas gingivalis* protease activity in colonization of oral surfaces. **Infect. Immun.**, 64(10):4067-4073.

Tusher, V.G.; Tibshirani, R.; Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 98:5116-5121.

van Loosdrecht, M.C.M.; Lyklema, J.; Norde, W.; Zehnder, A.J.B. (1990). Influence of interfaces on Microbial Activity. **Microbiol. Rev.**, 54(1):75-87.

Washburn, M.P.; Yates III, J.R. (2000). Analysis of the microbial proteome. **Curr. Opin. Microbiol.**, 3:292-297

Watnick, P.; Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. **J. Bacteriol.**, 182(10):2675-79.

- Wells, J.M.; Raju, B.C.; Hung, H.Y.; Weisburg, W.G.; Mandelco-Paul, L.; Brenner, D.J. (1987). *Xylella fastidiosa*: Gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 37:136-43.
- Wendisch, V.F.; Zimmer, D.P.; Khodursky, A.; Peter, B.; Cozzarelli, N.; Kustu, S. (2001). Isolation of *Escherichia coli* mRNA and comparison of expression using mRNA and total RNA on DNA microarrays. **Anal. Biochem.**, 290:205-213.
- Whiteley, M.; Banger, M.G.; Bumgarner, R.E.; Parsek, M.R.; Teitzel, G.M.; Lory, S.; Greenberg, E.P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, 413:860-864.
- Winderickx, J.; Castro, I.M. (1994). Practical course in molecular biology of microorganisms. pp 59-63. Universidade Federal de Ouro Preto, MG.
- Wong, K.W.; McClelland, M. (1994). Stress-inducible gene of *Salmonella typhimurium* identified by arbitrarily primed PCR of RNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 91:639-643.
- Woofaardt, G.M.; Lawrence, J.R.; Roberts, R.D.; Caldwell, S.J.; Caldwell, D.E. (1994). Multicellular organization in degradative biofilm community. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60(2):434-446.