Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de
Leifsonia xyli* subsp. *xyli

Daniel Dias Rosa

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Fitopatologia.

Piracicaba
2006

Daniel Dias Rosa
Engenheiro Agrônomo

**Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de *Leifsonia xyli*
subsp. *xyli***

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Fitopatologia.

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Rosa, Daniel Dias

Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subso. *xyli* / Daniel Dias Rosa. - - Piracicaba, 2006.
79 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

1. Bactérias gram-positivas 2. Cana-de-açúcar 3. Expressão gênica 4. Genes
5. Meio de cultura 6. Metionina 7. Raquitismo das soqueiras I. Título

CDD 633.61

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais, Dario e Neusa, e aos meus irmãos Dario jr, Darilene e Silvio,
Pela educação, amor e apoio em todos os momentos da minha jornada até aqui,

DEDICO

A minha querida e amada Juliana,
meu norte, sem ela eu seria apenas mais uma alma no mundo,
por seu amor e carinho.

OFEREÇO

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela Vida e o Universo que criou.

Agradeço ao Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação e profissionalismo.

Agradeço imensamente a Dra. Claudia Barros Monteiro-Vitorello pela valerosa co-orientação, os ensinamentos, carinho, amizade, estímulos e compreensão.

Aos Prof. Dr. Luis Roberto Nunes e Dra. Regina Oliveira pela ajuda nos experimento de expressão gênica realizados.

Ao departamento de fitopatologia da ESALQ/USP, nas pessoas dos professores do setor de fitopatologia pelos ensinamentos.

Aos funcionários Rodolfo, Fernanda, Edivaldo, Heloisa e Jéferson, pela imensa ajuda e amizade neste período.

Aos meus eternos tutores Prof. Dr. Nilton Luis de Souza e Dra. Eiko Eurya Kuramae pelos ensinamentos, amizade, orientação acadêmica, pessoal e ética.

A população do Laboratório de Genética Molecular: Ana Paula Teixeira, Ana Carolina Fazza, Profa. Dra. Neiva Tinti, Raphaelle Tomatusu, Osmar Vaz, Fátima, Juliana Teixeira, Dr. Reinaldo Barata, Adalgisa Thayne, Fernanda, Lílían Beloti e Marcia.

Aos amigos Karen, Frankin, Fabrício, Cristiane, Alejandro, Izolda, Cassiara, Thais, Leonardo, André, Silvio, Rock, Davi, José Segundo, Eliane, Liliane, Marília,

Os eternos amigos e companheiros de república Ângelo Sussel, Mônica, Ricardo Ferrari, Scheila Maciel e Mauricio Fialho pelas conversas descontraídas e pelos momentos alegres que passamos juntos.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo pelo projeto 04/05001-6.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) pela oportunidade.

E a todos que de alguma forma ajudaram este trabalho ser concretizado.

“Você não liga para nada exceto cachorros, caçar e pegar ratos.
Vai ser uma desgraça para você e para sua família.”

Robert Darwin recriminando a decisão de seu filho
em partir em viagem com o navio Beagle,
seu filho era Charles Darwin.

“da guerra da natureza, da fome e da morte, surge diretamente
o mais exaltado objetivo que somos capazes de conceber, ou seja,
a produção de animais mais evoluídos. Existe uma grandeza nesta visão da vida,
com suas varias forças, tendo sido originalmente criada em algumas
formas ou em apenas uma. E, enquanto este planeta orbitava,
de acordo com as leis fixas da gravidade, de um começo tão simples,
surgiram formas mais belas e mais maravilhosas, que continuam a evoluir”

Origem das espécies – Charles Darwin (1809-1870)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 DESENVOLVIMENTO.....	12
2.1 Revisão bibliográfica.....	12
2.1.1 O raquitismo-das-soqueiras	12
2.1.2 <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> (<i>Lxx</i>)	14
2.1.3 O genoma de <i>Lxx</i> e seu hábito de crescimento fastidioso	14
2.1.4 Tecnologia do microarranjo.....	17
2.1.5 Expressão gênica avaliada por meio de hibridização em microarranjo.....	21
2.2 Material e Métodos.....	23
2.2.1 Manutenção do isolado CTC B07 de <i>Lxx</i>	23
2.2.2 Obtenção da curva de crescimento	23
2.2.3 Testes de otimização de meio de cultura de <i>Lxx</i>	26
2.2.4 Expressão gênica de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> na presença de metionina	27
2.2.4.1 Curva de dose-resposta a metionina no crescimento de <i>Lxx</i>	27
2.2.4.2 Cultivo de <i>Lxx</i> na ausência e presença de metionina.....	28
2.2.4.3 Isolamento do RNA total.....	28
2.2.4.4 Construção de microarranjo de DNA da <i>Lxx</i>	29
2.2.4.5 Síntese e marcação de cDNA	31
2.2.4.6 Hibridização do microarranjo.....	31
2.2.4.7 Análise das hibridizações em microarranjo.....	32
2.3 Resultados e Discussão.....	33
2.3.1 Curva de crescimento de <i>Lxx</i>	33
2.3.2 Otimização de meio de cultura de <i>Lxx</i>	34
2.3.2.1 Fontes de carbono: Glicose, Frutose, Galactose, Manose	34
2.3.2.2 Fontes de vitaminas Cobalamina, Biotina, Tiamina e complexo vitamínico de Nitsch....	36
2.3.2.3 Fontes de ferro	38
2.3.2.4 Outros metais.....	39

2.3.2.5 Nutrientes combinados	41
2.3.3 Expressão gênica de <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> na presença de metionina	43
2.2.3.1 Curva de dose-resposta a metionina no crescimento de <i>Lxx</i>	43
2.3.3.2 Experimento de expressão gênica	44
2.3.3.3 Extração de RNA para Microarranjo.....	45
2.3.3.4 Síntese e marcação de cDNA	45
2.3.3.5 Obtenção da imagem e análise	46
2.3.3.6 Expressão gênica global de <i>Lxx</i>	49
2.3.3.7 Expressão de genes do metabolismo central	50
2.3.3.8 Metabolismo de metionina	51
2.3.3.9 Metabolismo de nitrogênio.....	54
2.3.3.10 Fatores de adaptação e elementos genéticos móveis	55
2.3.3.11 Genes hipotéticos conservados e hipotéticos.....	57
3 Conclusões.....	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS.....	69

RESUMO

Uma abordagem genômica para o entendimento do crescimento fastidioso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma das mais importantes culturas agrícolas. Cultivada em mais de 127 países, a cultura se apresenta como um dos alicerces para a socioeconomia e cultura de muitas regiões do Brasil e do mundo. Sua produtividade depende de diversos fatores, sendo esses atendidos pela intensa hibridação interespecífica visando principalmente à obtenção de cultivares mais produtivas, precoces e resistentes a diversos tipos de estresses. Entre os estresses, os causados por microorganismos são os mais relevantes e, dentre estes, destaca-se o agente causal da doença raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar, a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*). O estudo mais aprofundado sobre esta relação patógeno-hospedeiro é difícil, visto que *Lxx* é uma bactéria fastidiosa de difícil cultivo. O sequenciamento completo de seu genoma abriu a oportunidade de se entender às causas fisiológicas da dificuldade do seu cultivo. Assim, os objetivos deste trabalho foram otimizar um meio de cultura para *Lxx* com base em análise de vias metabólicas importantes e estudar a expressão diferencial de seus genes quando esta é cultivada na presença e ausência de metionina. Análises bioinformáticas do genoma de *Lxx* indicaram que esta está apta a utilizar diversas fontes de carbono, de vitaminas, de ferro e aminoácidos. De fato, dentre as fontes de carbono testadas verificou-se o crescimento de *Lxx* utilizando manose, frutose e galactose, embora em menor eficiência do que glicose. Observou-se também a utilização das vitaminas cobalamina, tiamina, biotina e complexo vitamínico de Nitsch, sendo que o acréscimo destes elementos resultou numa maior taxa de crescimento de *Lxx*. Verificou-se também que *Lxx* está apta a utilizar citrato, sulfato e cloreto de ferro como fontes deste metal, mas em menor eficiência que quando comparada a hemina bovina. Com estes resultados, verificamos que a adição do aminoácido metionina (1 g/L) e das vitaminas D-biotina (0,01 g/L) e cloreto de tiamina (0,01 g/L) obtém-se um desenvolvimento mais acelerado, em média 30%. Na análise da expressão gênica na presença da metionina, verificou-se uma regulação diferencial de 114 genes, sendo que destes 95 foram regulados positivamente e 19 negativamente. Os resultados indicam que *Lxx* necessita de metionina e que ela utiliza esse aminoácido como uma possível fonte de nitrogênio. Indicaram também que maior crescimento na presença de metionina está relacionado a uma regulação gênica positiva de genes do metabolismo central.

Palavras-chave: Raquitismo das soqueiras; Expressão gênica; Microarranjos; Meio de cultura.

ABSTRACT

A genomic approach for the understanding of the fastidious behavior of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is one of the most important tropical crops. Cultivated in more than 127 countries, it is of importance both for the social economy and culture of many regions of Brazil and of the world. Its productivity depends on diverse factors that are dealt with the intense interspecific hybridization aiming for more productive cultivars, that are resistant to diverse types of stress. Of these, stresses caused by microorganisms are the most relevant and among these the bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*), the causal agent of the ratoon stunting disease is one of the most important. The study of this patosystem, however, is very difficult, since *Lxx* is a fastidious bacterium. The availability of the complete genome sequence of *Lxx* made possible the understanding of the physiological causes of its fastidious behavior. Thus, the objectives of this work were to optimize the culture medium of *Lxx* by analyzing important pathways and to study gene expression when *Lxx* is cultivated in the presence and absence of methionine. Bioinformatic analyzes of the *Lxx* genome indicated that it is capable to use diverse sources of carbon, vitamins, metals, iron and amino acids. In fact *Lxx* was able to grow in the presence of mannose, fructose and galactose as the main sugar components of the medium, but not so efficiently as in glucose. It was also observed that the addition of the vitamins cobalamin, thiamin, biotin and the Nitsch's vitamin complex resulted in a better *Lxx* growth. It was also verified that *Lxx* is capable to use iron citrate, iron sulphate and iron chloride as the main sources of iron, but less efficiently than when compared to hemin bovine chloride. With these results, it was verified that the addition of methionine (1 g/L) and of the vitamins D-biotin (0.01 g/L) and thiamine chloride (0.01 g/L) resulted in a faster growth of *Lxx* in vitro by as much as 30% on average compared to the standard medium. Gene expression analyses showed that the addition of methionine to the medium resulted in an alteration of expression levels of 114 genes, 95 of which were up regulated and 19 otherwise. This result indicated that *Lxx* needs an outside source of methionine and that it uses this amino acid a source of nitrogen. Also, it indicated that the improved growth in the presence of methionine is highly correlated with up regulation of genes of the central metabolism pathways.

Keyword: ratoon stunting disease, gene expression, microarray, culture medium

1 INTRODUÇÃO

Cultivada em mais de 127 países subtropicais e tropicais, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) está entre as mais importantes culturas agrícolas do Brasil, sendo responsável por 25% da produção mundial. O setor sucroalcooleiro no Brasil é responsável por cerca de 1 milhão de empregos diretos na área rural e cerca de 300 mil empregos diretos ou indiretos na área industrial. A cultura ocupa uma área girando em torno de 5,9 milhões de hectares, sendo que 70,2% do total se localiza na região sudeste. A produção de 440 milhões de toneladas está dividida entre dois grandes setores, sendo que 379,1 milhões de toneladas são destinadas à indústria sucroalcooleira (219,2 milhões de toneladas para fabricação de açúcar e 177,9 milhões de toneladas para industrialização do álcool hidratado, anidro e neutro). O restante, 42,9 milhões de toneladas, destina-se à produção de derivados, como cachaça, rapadura e alimentação animal. No estado de São Paulo, a cana-de-açúcar se destaca como o primeiro produto agrícola, com uma safra de 263 milhões de toneladas no ano agrícola de 2005/2006, correspondendo a 59,7% de toda a produção do país e participando com 53,1% da área plantada total. O estado detém também o recorde nacional em produtividade, que gira em torno de 83.535 kg/ha (CONAB, 2005).

A cana-de-açúcar comercializada atualmente é resultante de intensa hibridação interespecífica, visando a obtenção de cultivares mais produtivas, precoces e resistentes a diversos tipos de estresses. Entre os estresses, os causados por microorganismos são os mais relevantes e, dentre estes, destaca-se o agente causal do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar, a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). Trata-se de uma bactéria de crescimento fastidioso em meio de cultura, o que a coloca dentro de um restrito grupo de bactérias fitopatogênicas de igual característica, junto a *Xylella fastidiosa* e *Pseudomonas syzygii* (PURCELL; HOPKINS, 1996). O seqüenciamento completo do genoma de Lxx forneceu informações importantes a respeito de sua fisiologia, principalmente relacionadas às rotas metabólicas de síntese e catabolismo de nutrientes essenciais para seu crescimento. Análises bioinformáticas indicaram que vários destes genes, como alguns envolvidos na síntese dos aminoácidos cisteína e metionina, provavelmente não são funcionais (“pseudogenes”) em função da ocorrência de possíveis mutações. A não funcionalidade destes genes, por sua vez, poderia

explicar, ao menos em parte, o hábito fastidioso de *Lxx*. Outros fatores possivelmente ligados a este hábito incluem o não suprimento de componentes essenciais à bactéria pelo meio de cultura utilizado para seu cultivo.

O presente estudo objetivou otimizar um meio de cultura mais adequado ao crescimento de *Lxx* com base em análises das vias metabólicas elaboradas a partir de seqüências de seu genoma bem como analisar comparativamente perfis de expressão gênica da bactéria quando cultivada *in vitro* na presença e ausência de metionina por meio de hibridização em microarranjo.

O estudo da fisiologia do crescimento desta bactéria é relevante para o entendimento dos mecanismos de utilização das fontes de carbono e síntese ou obtenção dos aminoácidos essenciais e vitaminas, mecanismos estes que, em última análise, são reflexos de sua adaptação ao habitat em que vive na planta, o xilema.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 O raquitismo-das-soqueiras

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinalis* L.) é uma das mais importantes culturas agrícolas brasileiras, ocupando 5,9 milhões de hectares com uma produção de 440 milhões de toneladas. No Estado de São Paulo são produzidas 263 milhões de toneladas, o que correspondente a 59,7% da produção brasileira. Nesta mesma região, a produtividade é recorde, atingindo 83.535 kg/ha (CONAB, 2005).

Por ser uma cultura que ocupa grandes extensões de terra, o controle químico das suas doenças é inviável. Dentre as doenças mais importantes desta cultura no país e no mundo, destaca-se o raquitismo-das-soqueiras (RSD – Ratoon Stunting Disease), doença causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) (DAVIS et al., 1980). O RSD foi primeiramente descrito em Queensland, na Austrália, em 1944, quando algumas plantas da variedade Q28 exibiram um retardo anormal no crescimento e descoloração vascular (JAMES, 1996). Nos vários anos seguintes, acreditou-se que se tratava de uma doença de etiologia viral, devido à dificuldade de isolamento do agente causal (CHAGAS; MATSUOKA, 1988; JAMES, 1996), até que, em 1973, Teakle; Smith e Steindl (1973) demonstraram a presença de uma bactéria associada à doença e, em 1984, Davis e colaboradores identificaram o agente causal como *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (DAVIS et al., 1984). Mais tarde, a bactéria foi re-classificada como *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (EVTUSHENKO et al., 2000).

Em 1989, *Lxx* já havia sido relatada em mais de 61 países (TOKESHI, 1997) e atualmente ocorre em todas as áreas onde se cultiva cana-de-açúcar, acarretando perdas de até 50% em variedades suscetíveis (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). Na Argentina, em recente levantamento, concluiu-se que 55,5% da área de cana-de-açúcar está infectada com *Lxx*, sendo que em algumas variedades cultivadas pode-se encontrar valores de até 89,5% de incidência

(RAGO et al., 2004). Na Florida, foram estimadas perdas de 5 a 15% por safra, que correspondem a US\$ 36,8 milhões (DAVIS; DEAN, 1984) e na Austrália, foram estimadas perdas de US\$ 11 milhões por ano (FEGAN et al., 1998). No Brasil, acredita-se que a doença já acarretou perdas de até US\$ 2 bilhões nos últimos 30 anos somente no estado de São Paulo (GIGLIOTE, 1998).

As perdas decorrem da redução da biomassa, que pode chegar a 50% em variedades suscetíveis submetidas a condições de estresse hídrico (TOKESHI, 1997; GILLASPIE; TEAKLE, 1989). Outro dano direto é a redução do número de cortes em talhões altamente infectados em função do comprometimento do crescimento das plantas: em média, a cultura permite até 4 cortes consecutivos em plantas saudas, ao passo que em talhões infectados este número reduz-se para aproximadamente dois, fazendo com que o custo advindo da renovação dos talhões aumente substancialmente (UNICA, 2004). Elevados índices de infecção são facilmente atingidos, uma vez que a bactéria pode ser transmitida para uma planta sadia através do contato com suco xilemático da planta doente veiculado pelo facão de corte (JAMES, 1996; GILLASPIE; TEAKLE, 1989).

A manifestação dos sintomas da doença está ligada diretamente às condições climáticas: em anos em que o índice pluviométrico é baixo, principalmente no período de seca, pode-se observar crescimento irregular e afinamento e encurtamento dos colmos. Ainda pode ser verificada, principalmente em variedades suscetíveis, alteração na cor da face inferior do nó do colmo, na forma de manchas no formato de “vírgulas”, variando de alaranjado-claro a vermelho-escuro. Estes sintomas, no entanto, não são exclusivos desta doença e podem não se manifestar em anos em que o índice pluviométrico é satisfatório (TOKESHI, 1997).

O controle de *Lxx* dá-se através da termoterapia do “tolete”, que consiste na imersão do tolete-semente em água com temperatura aquecida a 52°C por 30 minutos. No entanto, mesmo com o tratamento térmico, é indispensável a utilização da prática de “roguing”, que visa eliminar plantas doentes de viveiros de mudas (SANGUINO, 1989; TOKESHI, 1997).

2.1.2 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*)

O gênero *Leifsonia* foi criado por Evtushenko et al. (2000) para agrupar bactérias gram-positivas, não esporogênicas, caracterizadas pela presença de ácido 2,4 diaminobutírico em sua parede celular, metaquinonas com 9 a 10 cadeias de carbono e fosfatidilglicerol e difosfatidilglicerol como principais fontes de fosfolipídios (DAVIS et al., 1980; DAVIS, 1984; YOUNG et al., 1992; EVTUSHENKO et al., 2000), além do conteúdo de G+C variando de 66-73% (EVTUSHENKO et al., 2000). O nome do gênero foi dado em homenagem a Einar Leifson, o primeiro a isolar e descrever o primeiro organismo do gênero, *Leifsonia aquatica*. Dentro do gênero estão descritas atualmente oito espécies, isoladas de diversos ambientes, como amostras de solo, galhas de nematóides e até de um lago antártico (REDDY et al., 2003; SUSUKI et al., 1999; LEIFSON, 1962; LEE et al., 1997).

A espécie *Leifsonia xyli* compreende duas subespécies: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* (*Lxc*), sendo ambas patogênicas a gramíneas do gênero *Cynodon* (capim Bermuda ou grama seda). No entanto, *Lxc* só infecta cana-de-açúcar experimentalmente e sua infecção é assintomática. (DAVIS et al., 1980; LIAO; CHEN, 1981; HAAPALAINEN; MATTINEN; METZLER, 2000).

Leifsonia xyli subsp. *xyli* (DAVIS et al., 1984; EVTUSHENKO et al., 2000) é uma bactéria gram-positiva, fastidiosa, corineforme, não móvel, aeróbia obrigatória e restrita ao xilema das plantas de cana-de-açúcar. Suas células baciliformes medem de 0,25-0,5 µm por 1-4 µm, com forma reta ou levemente curva e, ocasionalmente, inchada na ponta ou no meio (TEAKLE et al., 1973). As colônias apresentam aspecto circular não pigmentado, com diâmetro variando de 0,1 a 0,3 mm em meio de cultura M-SC (TEAKLE; RYAN 1992).

2.1.3 O genoma de *Lxx* e seu hábito de crescimento fastidioso

Leifsonia xyli subsp. *xyli* pertence a um seletivo grupo de bactérias fitopatogênicas de crescimento fastidioso junto a *Xylella fastidiosa*. O meio de cultura de *Lxx*, meio M-SC (TEAKLE; RYAN 1992), o qual é uma versão modificada do meio S8 (DAVIS et al., 1984), baseia-se em uma fonte de nitrogênio, proveniente basicamente de peptona de soja, uma de ferro

quelatizado, na forma de hemina bovina e uma fonte de carbono na forma de glicose. Também faz-se necessária a adição do aminoácido cisteína e de albumina bovina, esta atuando provavelmente como uma fonte quelante de substâncias tóxicas.

Segundo MONTEIRO-VITORELLO et al. (2004), o genoma de *Lxx* estirpe CTC B07 apresenta um número elevado de “pseudogenes”, isto é, genes fragmentados ou que apresentam mudanças no sentido de leitura (“frameshift”) ou ainda códon de parada de leitura. Ainda segundo estes autores, este fenômeno pode explicar, ao menos em parte, o hábito fastidioso da bactéria. Os autores mostraram, por exemplo, que a adição de metionina ao meio aumentou a taxa de crescimento da bactéria, fato explicado pela provável não funcionalidade dos genes *metE* e *metF*, pertencentes à rota de síntese de metionina. O primeiro gene transcreve para metionina sintase independente de cobalamina, ao passo que o segundo transcreve para um ativador do regulador (*metJ*) do operon *metB-metL*, responsável pela síntese de γ -cistationina sintase, que catalisa a síntese de cistationina a partir de homoserina e L-cisteína (GREENE, 1996). Mutantes de *Streptomyces lividans* para o gene *metF* são auxotróficos para metionina (BLANCO et al., 1998).

Outro importante gene caracterizado como “pseudogene” é o gene *cysK*, relacionado à rota metabólica de cisteína (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Sua provável não funcionalidade explica a necessidade de adição de cisteína ao meio M-SC comumente usado para o cultivo de *Lxx* (TEAKLE; RYAN 1992), pois este gene participa ativamente na produção da cisteína sob condições de aerobiose, sendo responsável pela transcrição da enzima O-acetilserina (tiol)-liase A, enzima que promove a catálise entre O-acetil-L-serina e sulfito, gerando L-cisteína.

Outros fatores possivelmente ligados ao hábito de crescimento fastidioso incluem a ausência de genes de vias metabólicas importantes além do não suprimento de componentes essenciais à bactéria no meio comumente utilizado para seu cultivo, simplesmente devido ao desconhecimento de seus requerimentos nutricionais. Na rota metabólica das vitaminas, por exemplo, nota-se a ausência de alguns genes que transcrevem enzimas envolvidas na síntese das vitaminas cobalamina, biotina e tiamina, o que provavelmente torna a bactéria auxotrófica para estes compostos (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). O crescimento de *Lxx* no meio M-SC provavelmente se dá devido a presença destas vitaminas possivelmente na peptona de soja. Até o momento, no entanto, não há relato sobre o efeito de suplemento vitamínico em seu crescimento.

A análise da sequência genômica de *Lxx* indicou também que ela está apta a utilizar diversos açúcares além da glicose, principal fonte de carbono do meio M-SC. Como exemplo, nota-se a presença de genes que codificam um sistema fosfotransferase dependente de fosfoenolpiruvato (PTS -*PhosphoTransferase System*) para o transporte de frutose e manose (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), além de genes que codificam proteínas da família ABC-transportadora, que provavelmente estão envolvidos no transporte de vários açúcares (manose, galactose, maltose, maltotriose, arabinose, fucose, glicose, ribose, trehalose e xilose). Além do mais, *Lxx* possui todo o sistema enzimático de degradação e metabolismo destes açúcares, com exceção do gene frutose 1,6-bifosfatase, que está ausente em todas as actinobactérias (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). O estudo do efeito destas fontes de carbono no crescimento de *Lxx* é importante do ponto de vista de sua interação com o hospedeiro. A comprovação da utilização de manose por *Lxx* é particularmente interessante, uma vez que este é o açúcar presente em maior concentração no fluido do xilema (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2000).

A presença de transportadores de metais como ferro, magnésio, cálcio, manganês e zinco, também indica a possível utilização destes metais pela bactéria, assim como a presença de genes responsáveis pela oxi-redução e transporte de nitrito/nitrato, demonstrando uma possível utilização destas fontes de nitrogênio encontrada no xilema da planta de cana-de-açúcar (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

Em conjunto, estas informações podem ser utilizadas para a confecção de meios de cultura mais apropriados ao crescimento da *Lxx*, a exemplo de outras duas bactérias cujas sequências genômicas serviram de base para o mesmo propósito. Renesto et al. (2003) demonstraram que a utilização das informações obtidas através do sequenciamento do genoma da bactéria *Tropheryma whippelii* foi fundamental para o entendimento da sua fisiologia de crescimento, ponto importante para futuros estudos deste microorganismo. A elaboração de um meio de cultura axênico mais adequado para *T. whippelii* deu-se a partir de constatações de deficiências nas vias de biossíntese dos aminoácidos histidina, triptofano, leucina, arginina, prolina, lisina, cisteína e asparagina e também pela ausência do ciclo do ácido tricarboxílico, que leva à não produção de glutaminas e glutamato, produtos essenciais para a síntese de diversos outros aminoácidos. Outro exemplo da utilização das informações genômicas para confecção de meios mais adequados é o de Lemos et al. (2003), que trabalharam com *Xylella fastidiosa*. Neste trabalho, deu-se atenção às rotas metabólicas de biossíntese de aminoácidos e proteínas da

família ABC-transportadora de componentes orgânicos e inorgânicos, onde a adição dos aminoácidos serina, cisteína e metionina ao meio de cultivo deu-se pelo fato de que os genes que transcrevem para enzimas chaves das vias metabólicas destes aminoácidos, tais como serina acetiltransferase, cistatione β e γ liase estão ausentes no genoma desta bactéria. A adição destes aminoácidos resultou em um aumento significativo em seu crescimento, demonstrando com isso que a análise das exigências do crescimento é uma maneira de testar a anotação de genomas bacterianos.

2.1.4 Tecnologia do microarranjo

A genômica funcional vem emergindo como uma das novas áreas interdisciplinares, nas quais áreas clássicas como genética, bioquímica, matemática e informática se encontram. Esta ciência se vale de novas tecnologias, tal como análise de expressão gênica via hibridização em microarranjo (DANCHIN; SEKOWSKA, 2000; LANDER. 1996).

Desde do início da década de 70, a propriedade do princípio do pareamento de seqüências de DNA/RNA complementares vem sendo utilizada com o intuito de se conhecer mais sobre a expressão gênica. Gillespie e Spiegelman (1961) e Southern (1975) foram os primeiros a utilizar essa característica da molécula de DNA/RNA para análise da expressão gênica. Após alguns anos, Khrapko et al. (1989) aprimoraram a técnica de hibridização inicialmente de poucos genes em superfície porosa e flexível da membrana de nitro-celulose, para técnica que utiliza uma lâmina de vidro não porosa, não flexível e que hoje comporta até 100.000 genes impressos. Esta evolução tecnológica permitiu uma visão global da expressão gênica de qualquer organismo vivo, dado que hoje ela é utilizada em experimentos que vão desde o estudo da expressão gênica de bactérias resistentes a antibióticos até a expressão de tecidos tumorais humanos (YANG; BUCKLEY; SPEED, 2001).

O advento da tecnologia de microarranjo fez com que estudos de regulação e funcionalidade gênica tivessem um grande salto no final da última década, principalmente quando se uniu esta técnica com a técnica de hibridização de RNA mensageiro marcado com moléculas fluorescentes, seguido de leitura da lâmina em aparelhos de *scanner* de alta definição (WANG et al., 2001).

O delineamento experimental utilizado para a montagem de um microarranjo envolve três parâmetros principais: parâmetros econômicos, que contabilizam o custo do equipamento para confecção da lâmina e a própria produção desta; parâmetros físicos, como qualidade e origem das amostras; e parâmetros químicos, como a incorporação de compostos fluorescentes ao RNA mensageiro (mRNA) e a eficiência da hibridização competitiva (YANG; BUCKLEY; SPEED, 2001). A união de todos esses fatores deve ser analisada para o delineamento de um experimento, contabilizando assim procedimentos, números de repetições, estatística a ser utilizada e método de normalização (YANG; BUCKLEY; SPEED, 2001) (Figura 1).

O delineamento utilizado para confecção de experimentos que analisam situações de estresses, drogas ou crescimento, geralmente se baseia em uma comparação direta, ou seja, a amostra que é submetida ao estresse (amostra teste) é comparada diretamente à amostra que não é submetida ao estresse (amostra controle) (YANG; BUCKLEY; SPEED, 2001) (Figura 1).

A escolha dos genes a serem impressos na lâmina vem juntamente com a análise de parâmetros econômicos. Em organismos cuja sequência genômica está disponível, pode-se optar por duas alternativas: desenho de oligonucleotídeos para cada gene ou utilização dos fragmentos “shotguns” gerados no sequenciamento do genoma, sendo que, neste caso, estes devem apresentar uma cobertura mínima de 80% do gene em questão.

Após a construção da lâmina de microarranjo, a próxima etapa é a hibridização com mRNAs marcados com componentes fluorescentes. Geralmente utiliza-se os fluoróforos cyanamid 3 (Cy3) e cyanamid 5 (Cy5) como marcadores padrões. Após a incorporação destas moléculas, durante a síntese da segunda fita de cDNA, obtém-se uma população de cDNA marcado que é hibridizada aos genes impressos na lâmina. A leitura da hibridização é efetuada em um *scanner* orbital monocanal, ou seja, um *scanner* que efetua leitura de todos os pontos ao mesmo tempo e em apenas um canal de intensidade de luz por vez, que geralmente é de 550 nm e 650 nm, que corresponde a verde (Cy3) e vermelho (Cy5), respectivamente.

Após a leitura da lâmina, a próxima etapa é a normalização dos dados. Trata-se de um procedimento de suma importância que possibilita a comparação entre as intensidades dos sinais fluorescentes resultantes da hibridização sem a interferência de variações e erros sistemáticos, tais como erros inerentes à preparação das amostras, variações na hibridização, efeito espacial da lâmina, regulagem do *scanner* e diversos outros fatores (YANG; BUCKLEY; SPEED, 2001).

Figura 1 – Organização de um típico experimento de microarranjo. Um bom experimento de microarranjo começa com um simples e claro organograma

Para se obter dados normalizados, são empregados métodos estatísticos e algoritmos que levam em conta os sinais de “genes de normalização”, que são geralmente de expressão constitutiva (*house keeping*) e que não têm alteração na expressão em função dos tratamentos empregados. Entre eles temos, por exemplo, o gene malonil Coa (SAVLI et al., 2003). Em suma, a normalização é baseada na razão (R) da intensidade do sinal de hibridização do gene no tratamento teste pelo seu sinal de hibridização no tratamento controle, expresso em logaritmo na base 2 (Equação 1).

$$\log_2 R = \log_2 \frac{\textit{teste}}{\textit{controle}}$$

Equação 1 – Transformação da intensidade dos sinais em razão de intensidade em Log₂

Dentre os métodos de normalização, destaca-se o método de LOWESS (Locally Weighted Linear Regression), que foi descrito inicialmente por Cleveland (1979), mas que só obteve ampla divulgação com a publicação do trabalho de Yang et al. (2002). Neste trabalho, o autor apresenta diversos métodos de normalização, mas aponta o de LOWESS como o mais indicado para experimentos de hibridização DNA/cDNA, que consiste na normalização dos pontos por regressão linear. O processo do cálculo da regressão é essencialmente baseado na dependência da intensidade dos canais. Essa dependência é calculada para cada ponto do microarranjo observando a distância do ponto à curva da regressão. Esta dependência é chamada de $y(x_i)$. A idéia em linhas gerais é que a subtração da dependência do log₂ da razão das intensidades gere um valor normalizado corrigido (R') (Equação 2).

$$\log_2 R' = \log_2 R - y(x_i)$$

Equação 2 – Equação básica utilizada pelo método de normalização de LOWESS

Após a normalização, os dados estão prontos para as análises estatísticas e exploração dos resultados. Em análises de expressão diferencial gênica, diversos métodos estatísticos podem

ser empregados a fim de se identificar os genes que são regulados positivamente, negativamente ou co-regulados. Para isso, o método mais amplamente utilizado é o SAM (Significance Analysis of Microarrays). Este método foi proposto por Tusher, Tibshirani e Chu (2001) e o programa que o executa foi desenvolvido por Balasubramanian Narasimhan e distribuído pelo departamento de estatística da Universidade de Stanford (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>). Experimentos baseados em duas variáveis, como crescimento na presença e ausência de determinado produto, são analisados utilizando o método de duas classes pareadas (Two Class Paired). O resultado da análise é um valor de linha de corte em relação a quantas vezes o gene foi expresso, gerando assim também a probabilidade de falsos positivos com cada valor de corte escolhido (TUSHER; TIBSHIRANI; CHU, 2001).

2.1.5 Expressão gênica avaliada por meio de hibridização em microarranjo

Nos últimos anos, o acúmulo de conhecimento sobre a expressão gênica de bactérias patogênicas frente a diversas situações, tais como mudanças do meio ambiente, disponibilidade nutricional, pH, etc., contribuíram para o melhor entendimento do comportamento dos microorganismos perante estes fatores (SMOOT et al., 2001).

Smoot et al. (2001) demonstraram que a variação da temperatura no crescimento de *Streptococcus* spp. causou a expressão diferencial em 9% dos genes analisados. Os resultados indicaram que mudanças de temperatura ativaram a síntese de proteínas extracelulares, fatores de virulência, proteínas transportadoras e proteínas relacionadas a aquisição de metais, fazendo com que houvesse um aumento na agressividade da bactéria. Wagner et al. (2003) relataram que fatores relacionados ao meio ambiente e de regulação “*quorum-sensing*” na fase de crescimento fizeram com que 616 dos 5570 genes de *Pseudomonas aeruginosa* fossem diferencialmente expressos, observando-se que 450 genes foram expressos no início da fase estacionária e 244 foram expressos no meio da fase logarítmica de crescimento.

Tao et al. (1999) e Oh et al. (2002) demonstraram que houve um aumento na taxa de expressão gênica quando glicose foi substituída por acetato como fonte de carbono no crescimento de *E.coli*. Esta substituição resultou na expressão diferencial de 225 a 362 genes, sendo estes relacionados ao metabolismo de moléculas e não ao metabolismo da divisão celular,

transcrição ou tradução, evidenciando que o cultivo em meio de cultura com uma fonte de carbono de baixa assimilação ocasiona uma maior expressão gênica do metabolismo de carbono acompanhada de uma redução na taxa de crescimento.

Em *Erwinia chrysanthemi* 3937, Okimaka et al. (2001) observaram a regulação de 89 genes durante o processo de infecção de folhas de violeta africana (*Saintpaulia iomantha* var. *katja*), sendo que 74 genes foram regulados positivamente e 15 genes foram regulados negativamente. Essa quantidade de genes correspondeu a 1,7% do total de genes testados.

Dentre as bactérias gram-positivas, tem-se poucos experimentos de expressão gênica diferencial por meio de microarranjo, podendo salientar os experimentos efetuados com *Corynebacterium glutamicum*. Lange et al. (2003) relataram uma inibição do crescimento de uma estirpe produtora de valina na presença de alta concentração deste aminoácido, fato não observado em estirpes selvagens. Na análise da expressão diferencial de *C. glutamicum*, os autores observaram que 39 genes foram regulados, sendo 23 negativamente e 16 positivamente. Na análise destes genes diferencialmente expressos, concluiu-se que a inibição do crescimento de *C. glutamicum* se deve à inibição, por competição, da utilização dos aminoácidos isoleucina e leucina, levando a uma parada em seu metabolismo.

Hayashi et al. (2006) demonstraram que o isolado de *C. glutamicum* produtor de L-lisina apresenta uma produção excessiva deste aminoácido possivelmente pela ausência do mecanismo repressor de sua via biosintética, sendo observado que em isolados selvagens esse mecanismo se mostra funcional. A ausência de repressão da via deve-se possivelmente a mutações nos genes de repressão.

Tomados em conjunto, estas informações indicam que o uso da tecnologia de hibridização em microarranjo se mostra eficiente para o entendimento da fisiologia molecular das bactérias, tecnologia que foi empregada neste trabalho para o entendimento da fastidiosidade de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Manutenção do isolado CTC B07 de *Lxx*

A estirpe CTC B07 de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, depositada na coleção de bactérias do Instituto Biológico sob número IBSBF 1853, foi utilizada em todos experimentos. Este isolado foi mantido em meio de cultura M-SC modificado (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), alterado a partir do meio M-SC (TEAKLE; RYAN 1992) pelo acréscimo de 0,5 g/L de metionina. O meio M-SC, por sua vez, é a modificação do meio de cultura S8, descrito por Davis et al. (1980). O meio de cultura utilizado para a manutenção do isolado, assim como os outros meios de culturas estão descritos na tabela 1, sendo que o meio de cultura M-SC modificado foi nomeado como M1. O isolado também foi mantido em cultura conservada em glicerol a 25% em freezer a -80°C.

2.2.2 Obtenção da curva de crescimento

Para a obtenção da curva de crescimento de *Lxx* iniciou-se primeiramente a produção de um inóculo líquido, o qual foi obtido pela transferência de colônias de *Lxx* cultivadas em meio M-SC sólido modificado por MONTEIRO-VITORELLO et al. (2004) (meio M1, Tabela 1) por 10 dias a 28°C para 50 mL de meio líquido seguido de incubação sob agitação (130 rpm) por 4 dias a 28°C. O meio sólido é obtido adicionando-se 17 g/L de ágar de milho e 4 g/L de ágar bacteriológico antes da autoclavagem.

Utilizou-se 250 mL de meio de cultura para o experimento da curva de crescimento, sendo que antes de sua inoculação com o inóculo foram retiradas 10 amostras de 5 mL para servirem como amostras de referência (branco) em leituras no espectrofotômetro. O volume restante foi inoculado com 2 mL de inóculo. Depois de adicionado este, o frasco foi agitado de modo a homogeneizar seu conteúdo e então alíquotas de 5 mL foram retiradas e dispensadas em 30 tubos “Corning” de 25 mL. Estes foram incubados por um período máximo de 10 dias a 28°C

sob agitação. A cada dia de incubação, 3 tubos foram escolhidos ao acaso e utilizados para leituras de densidade óptica em espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro (Amershan Pharmacia biotech) a 600 nm. Alíquotas de 100µL foram retiradas de cada tubo e submetidas a diluições seriadas. Alíquotas de 100µL destas diluições foram plaqueadas em meio sólido e incubadas por 10 dias a 28°C para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

Tabela 1 – Composições dos meios de cultura formulados a partir do meio M-SC (TEAKLE; RYAN 1992)

Componentes	Meios de cultura (gramas ou mililitros por litro)																	
	M-SC	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17
Peptona de soja	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g	8g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g	0,2g
K ₂ HPO ₄ (0,1 M)	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL	13mL
KH ₂ PO ₄ (0,1 M)	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL	87mL
Hemina bovina 0,1% ^a	30mL	30mL	30mL	30mL	30mL	30mL	30mL	30mL	30mL	--	--	--	30mL	30mL	30mL	30mL	30mL	30mL
Citrato de ferro	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,02g	--	--	--	--	--	--	--	--
Sulfato de ferro	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,01g	--	--	--	--	--	--	--
Cloreto de ferro	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,01g	--	--	--	--	--	--
Sulfato de zinco	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,02g	--	--	--	--	--
Cloreto de manganês	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,02g	--	--	--	--
Cloreto de cobalto	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,02g	--	--	--
Glicose ^d	5g	5g	--	--	--	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g	5g
Frutose ^d	--	--	5g	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Galactose ^d	--	--	--	5g	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Manose ^d	--	--	--	--	5g	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Cisteína ^d	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g
Metionina ^d	--	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	1g	1g	1,5g
Albumina bovina ^{b d}	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g	2g
Cobalamina ^d	--	--	--	--	--	0,01g	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Biotina ^d	--	--	--	--	--	--	0,01g	--	--	--	--	--	--	--	--	0,01g	--	--
Cloreto de tiamina ^d	--	--	--	--	--	--	--	0,01g	--	--	--	--	--	--	--	0,01g	--	--
Vit. de Nitsch ^{c d}	--	--	--	--	--	--	--	0,2mL	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

a – Solução de Hemina bovina – Sigma do tipo I em NaOH 0,05N; b – Fração V; c – Concentrado de vitamina de Nitsch, em mL/L, que contém Biotina 0,01 mg/L; Ácido fólico 0,1 mg/L; Glicina 0,4 mg/L; Mio-inositol 20 mg/L; Ácido nicotínico 1mg/L; Hidrocloreto de piridoxina 0,1 mg/L; Hidrocloreto de tiamina 0,1 mg/L. ; d –Componentes esterilizados por filtração em filtro 0,22µm

2.2.3 Testes de otimização de meio de cultura de *Lxx*

A otimização do meio de cultura da *Lxx* se deu a partir de modificações do meio M-SC modificado (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Os meios testados e suas composições estão relacionados na tabela 1. Foram testados os açúcares frutose, galactose e manose em substituição a glicose. Também foram testados os efeitos da adição das vitaminas cobalamina, D-biotina, cloreto de tiamina e complexo vitamínico de Nitsch; das fontes de ferro, citrato de ferro, cloreto de ferro e sulfato de ferro em substituição a hemina bovina; e dos metais, cloreto de cobalto, sulfato de zinco e cloreto de manganês. As classes de compostos (açúcar, vitamina, compostos férricos e outros metais) foram testadas em experimentos distintos realizados em duplicata. Após os testes individuais de compostos, efetuou-se a combinação dos nutrientes que apresentaram os melhores resultados. O inóculo líquido utilizado em todos experimentos foi obtido como descrito anteriormente. A montagem dos experimentos se deu utilizando-se 100 mL de meio de cultura contendo cada um dos componentes testados individualmente ou combinados (Tabela 1), sendo que antes de sua inoculação com o pré-inóculo, retirou-se 5 amostras de 5 mL cada para servirem como amostras de referência (branco) nas leituras em espectrofotômetro. O volume restante foi inoculado com 0.75 mL de suspensão de inóculo. Depois da adição deste, o frasco foi agitado de modo a homogeneizar seu conteúdo e então alíquotas de 5 mL foram retiradas e dispensadas em 15 tubos “Corning” de 25 mL. Estes foram incubados por um período máximo de 10 dias a 28°C sob agitação (Figura 2). A cada 48 horas de incubação a 28°C sob agitação, 3 tubos foram escolhidos ao acaso e utilizados para leituras de densidade óptica (DO). Este procedimento foi realizado até o décimo dia, quando o experimento foi encerrado. Leituras de DO foram efetuadas como descrito anteriormente.

Figura 2 – Esquema ilustrativo da montagem do experimento com 4 fontes de carbono. A montagem dos demais experimento seguiu este mesmo delineamento

2.2.4 Expressão gênica de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na presença de metionina

2.2.4.1 Curva de dose-resposta a metionina no crescimento de *Lxx*

Visando a determinação da melhor dose do aminoácido metionina a ser utilizada no experimento de análise de expressão gênica induzida por este aminoácido, realizou-se uma curva de medição do crescimento bacteriano dependente da dose do aminoácido. O crescimento de *Lxx* em meio M-SC modificado (0,5 g/L de metionina) (M1) foi comparado ao crescimento na ausência do aminoácido (M-SC) e na presença deste nas concentrações de 1g/L (M16) e 1,5 g/L (M17).

2.2.4.2 Cultivo de *Lxx* na ausência e presença de metionina

Para análise da expressão gênica de *Lxx* na presença de metionina, iniciou-se seu cultivo em 600 mL de meio M-SC (0 g/L de metionina). Após a inoculação desta cultura com um volume de 0,1% de inóculo líquido obtido conforme descrito no item 2.2.2, a cultura foi homogeneizada e dividida em dois volumes de 300 mL que foram incubados por 6 dias a 28°C sob agitação de 130 rpm. No 6º dia efetuou-se a suplementação com 5 mL de uma solução aquosa de metionina, na concentração de 1 g/L em uma das culturas, ao passo que na outra efetuou-se a adição de mesmo volume de água. A cultura que recebeu o suplemento aquoso de metionina foi designada de T1 e a que não recebeu o aminoácido metionina foi designada de T0. Após a suplementação, as culturas foram incubadas novamente a 28°C a 130 rpm por um período de 24 horas. Após este período efetuou-se a extração de RNA.

2.2.4.3 Isolamento do RNA total

O RNA total foi isolado utilizando-se o protocolo de extração descrito por Bowtell e Sambrook (2002). Algumas mudanças neste protocolo foram efetuadas para maximizar o rendimento, principalmente relacionadas à quantidade de lisozima e volume de fenol saturado utilizado em algumas etapas, visto que este protocolo foi descrito para extração de RNA em *E. coli*, bactéria gram-negativa.

Um volume de 10 mL de cultura bacteriana (DO=0,3 a 600 nm) foi acondicionado em tubos de 50 mL, acrescido de 1,25 mL de uma solução de etanol e 5% (v/v) de fenol saturado em água tratada com DEPC (Dietilpirocarboneto) a pH <7,0. A mistura foi centrifugada por 20 minutos a 4000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* congelado em nitrogênio líquido. As células foram então ressuspensas em 800 µL TE (Tris, 10 mM pH 8,0; EDTA, 0,1 mM) contendo 10 mg/mL de lisozima (Boehringer Mannheim), 0,5 mg/mL de proteinase K, transferidas para microtubos livres de *RNAse* de 2 mL, adicionadas de 80 µL de SDS 10% e incubadas em banho-maria a 64°C por 2 minutos. Após a incubação, adicionou-se 88 µL de NaOAc 1M pH 5,2 e misturou-se vagarosamente. Adicionou-se igual volume de fenol

saturado em água pH<7,0. Após incubação a 64°C por 6 minutos, os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm a 4°C e a fase superior foi transferida para outro microtubo, ao qual adicionou-se igual volume de clorofórmio seguido de centrifugação por 5 minutos a 14000 rpm, a 4°C. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e o RNA foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol gelado e 1/10 do volume de NaOAc 3M pH 5,2, 1mM EDTA. Após incubação por 20 minutos a -80°C, procedeu-se uma centrifugação a 14000 rpm por 25 minutos a 4°C. O *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de água livre de *RNAse* e purificado para remoção do DNA genômico contaminante em colunas RNEasy mini spin (RNEasy Plant Mini Kit, Qiagen) conforme instruções do fabricante. Após a purificação, as amostras mantidas em freezer a -80°C até o momento de uso.

A confirmação da ausência de DNA foi feita pela tentativa de amplificação de fragmento do gene ribossomal bacteriano 16S através da reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando os iniciadores universais 968 *forward* (AACGCGAAGAACCTTAC) e 1401 *reverse* (CGGTGTGTACAAGACCC) (NUBEL et al., 1996). O programa de amplificação consistiu de 3 minutos de desnaturação a 94°C seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C. Uma extensão final por 5 minutos a 72°C foi realizada após os 25 ciclos.

2.2.4.4 Construção de microarranjo de DNA da *Lxx*

As lâminas construídas e utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas e gentilmente cedidas pela Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello. Foram produzidas em parceria com o Dr. Luiz Nunes do Núcleo de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes – UMC, local onde foram efetuadas as hibridizações em microarranjo.

Para o preparo das lâminas de microarranjo, inicialmente utilizou-se um algoritmo de análise *in silico* de escolha de fragmentos “shotgun” com maior cobertura (90% de cobertura) e menor valor de *e-value* ($<e^{-200}$) para cada gene do genoma da *Lxx*. Com base na informação de endereçamento de cada fragmento, efetuou-se a busca de todos os clones dos fragmentos elegidos na biblioteca de plasmídeo, estocada em freezer a -80°C, no Departamento de Fitopatologia, Entomologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ-USP.

Os insertos dos clones foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos M13F e M13R. As reações de amplificação em 60 µL foram precipitadas com isopropanol e ressuspensas em 15 µL de 3xSSC (0,045 M de citrato trisódio, 0,45 M de cloreto de sódio, diluídos em água ultrapura tratada com DEPC e pH 7,0) antes da impressão na lâmina. Todo o processo foi realizado utilizando o robô GMS417 Arrayer (Genetic Microsystems/Affimetrix) segundo Derisi et al. (1997). A construção da lâmina se deu com a impressão de 2400 produtos de PCR que abrangeram as 2326 ORFs preditas do genoma da *Lxx*, sendo que alguns produtos de PCR, abrangendo os mesmos genes, foram impressos em duplicata, principalmente por que alguns fragmentos de PCR abrangem duas ORFs. Todos os produtos de PCR foram impressos em duplicata totalizando assim 4800 ORFs por lâmina. Colocou-se 300 ORFs em cada quadrante, totalizando 8 quadrantes (Figura 3).

Figura 3 – Visão geral da lâmina, com as duas repetições internas. Visão ampliada de um quadrante da lâmina e anotação de um gene de *Lxx*

2.2.4.5 Síntese e marcação de cDNA

Para a produção da primeira fita de DNA complementar (cDNA) foram utilizados 50 ng de oligonucleotídeos hexâmeros randômicos (Amersham-Pharmacia), os quais foram adicionados na reação de síntese do cDNA juntamente com 30 ng de RNA total, 6 µL de 5X tampão da enzima transcriptase reversa Superscript II, 3 µL de DTT, 0,6 µL de dNTP's a 25 mM cada e 200 U de transcriptase reversa Superscript II (Life Technologies, Inc.). A reação foi incubada a 42°C por 2 horas. Após esse tempo foi adicionado 1 µL de RNase (10 mg/mL) e a mistura foi incubada por 30 minutos à 37°C. Após esse período, efetuou-se uma lavagem em coluna Microcon 30 (Amicon) e centrifugou-se a 10000 rpm por 8 minutos. Com o volume coletado de 21 µL iniciou-se a síntese da segunda fita de cDNA, onde, após desnaturação do mesmo por 10 minutos a 95°C, adicionou-se 50 ng de oligonucleotídeos randômicos, 5 µL de uma solução de dNTP's (25 mM de dATP, dTTP, dGTP e 10 mM de dCTP), 1 µL (50 U/µL) de polimerase Klenow (Life Technologies, Inc.) e 2 µL do marcador fluorescente 5-amino-propargil-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (Amersham-Pharmacia), sendo o Cy3-dCTP usado para a marcação na amostra que não recebeu o tratamento (T0) e o Cy5-dCTP usado para marcar a amostra que recebeu o tratamento (T1). A reação foi incubada por 2 horas a 37°C. Após a incubação efetuou-se 3 lavagens em coluna Microcon 30 (Amicon), visando a purificação e concentração do cDNA antes da hibridização, sendo que o volume coletado no final das lavagens foi de 14 µL.

2.2.4.6 Hibridização do microarranjo

A hibridização foi realizada de acordo com Behr et al. (1999). A solução de hibridização consistiu da mistura de 14 µL da solução de cDNA e 86 µL de tampão de hibridização [5X SSP (0.9M NaCl; 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,0), 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 1X reagente de Denhardt (0,5 g de ficoll, 0,5 g de polivinilpirrolidona e 0,5 g de BSA - Fração IV) e 100 µg de DNA de esperma de salmão]. A hibridização foi efetuada em uma câmara de hibridização umidificada da estação de hibridização GeneTac (Genomic Solutions) por 15

horas a 65°C. Após este período, a lâmina foi lavada com uma solução de 0,5X de SSPE (3M NaCl, 200mM fosfato de sódio; 20mM EDTA; água, pH 7,4) e 0,2% SDS por 3 vezes de 5 minutos a temperatura ambiente e 5 vezes a 65°C por 30 minutos. Após a lavagem, efetuou-se a leitura da lâmina em aparelho *GMS418 ArrayScanner Genetic Microsystems/Affimetrix* em dois canais diferentes, sendo o primeiro na frequência de 550 nm para captação do sinal da marcação com Cy3-dCTP e o segundo na frequência de 650 nm para a captação do sinal da marcação com Cy5-dCTP.

2.2.4.7 Análise das hibridizações em microarranjo

Os sinais de hibridização foram analisados por meio do programa Spotfinder 3.10 do pacote de programas TM4 do TIGR (The Institute for Genomic Research) (SAEED et al., 2003) utilizando-se uma grade com 4 metalinhas e 2 metacolumnas, com 10 linhas por 30 colunas e espaçamento no eixo X de 22,5 pixel e no eixo Y de 30 pixel.

As análises estatísticas das intensidades dos sinais de hibridização foram efetuadas utilizando-se o programa TMEV do pacote TM4 do TIGR. A normalização foi efetuada pelo método de LOWESS, com auxílio de genes normalizadores (Tabela 2). A análise pelo método de análise de significância de microarranjo – SAM (Significance Analysis of Microarrays) foi utilizada para identificar genes diferencialmente expressos, onde utilizou-se um valor de corte de $\log_2=3$.

Tabela 2 Genes de expressão constitutiva utilizados na normalização dos dados

Gene ID	Gene	Símbolo
1460	1,4-dihidroxi-2-naphthoate octaprenyltransferase	<i>menA</i>
6070	ornithine carbamoyltransferase	<i>argF</i>
6990	ATP synthase, A chain	<i>atpB</i>
10790	preprotein translocase, YajC subunit	<i>yajC</i>
15120	histidinol dehydrogenase	<i>hisD</i>
19030	serine/threonine kinase	
7050	ATP synthase, beta chain	<i>atpD</i>
7150	translation initiation factor IF-2	<i>infB</i>
20640	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	<i>rpoB</i>
1720	pyrroline-5-carboxylate reductase	<i>proC</i>
21470	dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>folB</i>
10460	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	<i>paaH</i>

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Curva de crescimento de *Lxx*

O crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (*Lxx*) foi avaliado através de medições de densidade óptica do meio de cultura, realizadas a cada 24 horas após a inoculação por um período de 10 dias. Trata-se do primeiro relato de curva de crescimento para *Lxx* e a análise da curva (Figura 4) mostrou que valores de densidade óptica entre 0,1 a 0,6 correspondem à fase exponencial da cultura e equivalem aproximadamente a 4×10^{10} UFC/ mL e 6×10^{13} UFC/mL, respectivamente.

Figura 4 - Curva de crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, a cultura foi iniciada com 1% (v/v) de um pré-inóculo com DO=0,106. Barras verticais correspondem ao desvio padrão calculado com base nos valores de leituras de três tubos

De posse destas informações, calculou-se o tempo de geração (G) de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* utilizando a fórmula padrão de crescimento exponencial $G=T/N$, onde T é o tempo transcorrido entre o início e o final do experimento e N é o número de gerações calculado pela fórmula $N=\text{Log}(Y/X)/\text{Log} 2$, onde Y é o número de UFC obtidas no final do período analisado e X é o número de UFC obtidas no início (LAMANNA et al., 1973). O tempo de geração de *Lxx* foi calculado em 6,9 horas por geração. A título de comparação, Haapaleinem et al. (2000) relataram que o tempo de geração da outra subespécie, *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*, bactéria considerada não fastidiosa, é de 4,3 horas por geração. Em contrapartida, *Escherichia coli* apresenta um tempo de geração de 15 minutos por geração (CHALKLEY; KOORNHOFE, 1985), o que fornece uma idéia do crescimento fastidioso de *Lxx*.

2.3.2 Otimização de meio de cultura de *Lxx*

2.3.2.1 Fontes de carbono: Glicose, Frutose, Galactose, Manose

O crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi comparado em meios de cultura contendo quatro fontes de carbono (glicose, frutose, galactose e manose) (Figura 5). Os resultados mostraram que a bactéria cresceu mais rapidamente em meio contendo glicose (meio M1). No 6º dia de cultivo, a densidade óptica foi aproximadamente 3 vezes superior à verificada para o meio contendo galactose (meio M3). A utilização de glicose como principal fonte de carboidrato comprova a teoria que a glicose é a fonte de carbono e energia mais utilizada universalmente por bactérias, arqueobactérias e eucariotos (ROMANO; CONWAY, 1996).

Com relação à galactose, esperava-se que não houvesse desenvolvimento ou um desenvolvimento insignificante, haja vista que Monteiro-Vitorello et al.(2004) relataram que a única cópia da ORF homóloga ao gene galactokinase (*galK*), que transcreve para enzima chave no processo de degradação da galactose, é provavelmente um pseudogene. Em análise recente efetuada nesta ORF (dados não apresentados), no entanto, notou-se que a ORF está completa e sem problema de códon de parada, mostrando as cinco regiões conservadas deste gene (VERHEES et al., 2002).

Figura 5 - Curvas de resposta a fontes de carbono no meio de cultura da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. Barras verticais correspondem ao desvio padrão calculado com base nos valores de leituras de três tubos

A utilização de manose, mesmo que em menor eficiência se comparado à glicose, mostra que as ORFs de utilização deste açúcar, tais como *Lxx6600*, que transcreve para o sistema PTS, que inclui a permease relacionada a frutose e manose, e *Lxx5180*, homóloga ao gene manose-6-fosfato isomerase, provavelmente estão funcionais em *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, resultado que corroboram com as análises *in silico*. Além disto, a constatação do crescimento lento na presença deste açúcar está de acordo com a lenta colonização do hospedeiro por parte da bactéria, que demora até 7 meses para causar sintomas (TOKESHI, 1997) uma vez que manose é o açúcar em maior concentração no xilema (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2000).

Não se observou crescimento da *Lxx* na presença de frutose (Figura 5), embora *Lxx* apresente ORFs homólogas aos genes da rota metabólica deste açúcar, tais como frutokinase (*Lxx1600*) e inclusive o sistema PTS e a permease relacionada ao transporte de manose e frutose (*Lxx6600*). Esta discrepância pode se dever à produção de metabólicos tóxicos provenientes da rota do metabolismo da frutose, tais como dihidroxiacetona, ou ainda à produção de CO₂ no meio

de cultura, que pode contribuir para alterações do pH do meio desfavorecendo o crescimento da bactéria, a exemplo do descrito para *Corynebacterium glutamicum* por Dominguez et al.(1998). Por outro lado, deve-se considerar também a possibilidade de que a previsão das funções das ORFs identificadas acima não esteja correta

2.3.2.2 Fontes de vitaminas Cobalamina, Biotina, Tiamina e complexo vitamínico de Nitsch

Análises das rotas metabólicas da biotina, tiamina e cobalamina evidenciaram que muitas das ORFs homólogas aos genes destas rotas estão ausentes em *Lxx* (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004). De fato, notou-se um incremento no desenvolvimento de *Lxx* na presença das vitaminas em relação ao meio padrão (M1), a partir do 4º dia de crescimento (Figura 6), resultado que está de acordo com a hipótese de MONTEIRO-VITORELLO et al. (2004) de que *Lxx* necessita de suplementos vitamínicos devido à ausência de genes importantes que compõem a via metabólica da biotina, tiamina e cobalamina como discutido abaixo. O crescimento de *Lxx* em meio de cultura com complexo vitamínico de Nitsch (NITSCH; NITSCH, 1969) foi melhor se comparado aos outros, fato que pode ser devido à presença das vitaminas biotina e tiamina, uma vez que quando adicionadas individualmente, as duas vitaminas também resultaram em incremento no crescimento.

No caso de biotina, a necessidade de *Lxx* por esta vitamina provavelmente deve-se à ausência da ORF homóloga ao gene *btd*, que transcreve para biotinidase, enzima responsável pela quebra de N6-biotinil-L-lisina em biotina e L-lisina e o gene *bioB*, que transcreve para biotina sintetase, enzima chave no processo de catabolismo de ditiobiotina na presença de sulfato, gerando biotina. Por outro lado, na rota metabólica desta vitamina em *Lxx* encontramos a ORF homóloga ao gene biotina co-ligase, que transcreve para a enzima que cataboliza a reação de biotina, na presença de ATP, em pirofosfato mais biotinil-5'-AMP, sendo que o produto pirofosfato é um importante substrato para a rota metabólica de síntese de ácidos graxos e na fosforilação oxidativa, sugerindo que embora não produza, *Lxx* está apta a utilizar biotina para o metabolismo de ácidos graxos a partir de fontes externas, provavelmente supridas pelo hospedeiro.

Figura 6 – Crescimento da *Lxx* em meios suplementados com cobalamina, biotina, tiamina e vitamina de Nitsch e em meio não suplementado. Barras verticais correspondem ao desvio padrão calculado com base nos valores de leituras de três tubos

No caso da tiamina, notou-se que as principais ORFs homólogas a sua rota metabólica estão ausentes, tais como *thiC*, *thiD* e *thiE*, além de uma fosfatase responsável pela produção da tiamina a partir de tiamina fosfatase, mas presentes em outras actinobactérias, tais como *Mycobacterium bovis* e *Corynebacterium glutamicum* (<http://www.genome.jp/kegg/>). Outra rota metabólica alternativa para produção de tiamina, e presente em *Salmonella typhimurium*, a rota do ketapantoato redutase (FRODYMA; DOWNS, 1998), foi analisada em *Lxx*, mas não foi identificada.

Observou-se um ligeiro aumento no crescimento no meio contendo cobalamina (Figura 6), o que pode sugerir que *Lxx* é deficiente para a produção desta vitamina, provavelmente devido às ausências das ORFs homólogas aos genes *cobO*, responsável pela enzima cobalamina adenosiltransferase, e o gene SC5F7, responsável pela enzima cobalamina

(5'-fosfatase) sintetase. Cobalamina é conhecida por atuar como cofator, chave de inúmeras reações, tais como degradação de glicerol e etanolamina, e síntese de metionina.

2.3.2.3 Fontes de ferro

Com relação a fontes de ferro, observou-se crescimento mais rápido na presença de ferro tipo heme, suprido na forma de hemina bovina (M1) (Figura 7). A utilização de ferro do tipo heme já foi relatada para diversas bactérias, principalmente para bactérias patogênicas, onde há uma relação entre esta fonte de ferro e patogenicidade (LEUNG; FOLK, 2002), como descrito em *Streptococcus pneumoniae* (TAI; LEE; WINTER, 1993). Por outro lado, Andrews (1998) relata que fontes de ferro que participam diretamente da rota metabólica de protoporfirina, como é o caso do ferro heme, são utilizadas como fontes de armazenamento de ferro, sendo que estas contribuem para ativação de processos biológicos e resistência a estresses de oxi-redução impostas pelo ambiente. Schmitt (1997) relata que o sistema de aquisição e transporte de fontes de ferro do tipo heme não é completamente conhecido em bactérias gram-positivas, mas que em muitas bactérias, como *Corynebacterium diphtheriae*, a aquisição pode estar relacionada com a presença de gene homólogo ao gene heme oxigenase de eucariotos. Em *Lxx*, a ORF *Lxx24860* apresenta homologia a este gene, o que pode explicar sua utilização de hemina bovina.

A figura 7 indica também que *Lxx* pode utilizar citrato de ferro (M9), embora seu crescimento seja bem menos acentuado. Este fato é importante, pois é uma fonte de ferro comum no fluido de xilema de plantas (LÓPEZ-MILLÁN et al., 2000). *Lxx* possivelmente utiliza-se de citrato de ferro possivelmente pela presença da ORF homóloga ao gene *fepD*, que codifica para o sistema de transporte de dicitrato de ferro (III) (CROSA; WALSH, 2002).

Na presença de sulfato de ferro (M10) ou cloreto de ferro (M11) observou-se um ligeiro crescimento que evidencia uma possível baixa afinidade da bactéria por estas fontes inorgânicas de ferro, mesmo observando-se a presença de ORFs homólogas aos genes responsáveis pelo transporte de ferro inorgânico do sistema ABC transportador, proteína de ligação ao ABC transportador de ferro – *AfuA* (*Lxx14040*) e permease do transportador ABC – *AfuB* (*Lxx14070*), este fato pode sinalizar que a bactéria não utiliza fontes inorgânicas de ferro, mesmo apresentando o sistema de transporte, ou que as ORFs que apresentam homologia ao

sistema de transporte de ferro na verdade devem transportar outro tipo de metal e não ferro inorgânico, sendo que estas, possivelmente, foram identificadas como transportadoras de ferro pela dificuldade de diferenciação das famílias de transportadores de metais.

Figura 7 - Curvas de resposta a fontes de ferro no meio de cultura da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, a cultura foi iniciada com 1%(v/v) de um pré-inóculo com DO=0,104. Barras verticais correspondem ao desvio padrão calculado com base nos valores de leituras de três tubos

2.3.2.4 Outros metais

A adição tanto de zinco, como de manganês ou cobalto tiveram efeito deletério sobre o crescimento de *Lxx* (Figura 8). Acredita-se que, em todos os casos, isto se deva ao efeito tóxico destes elementos em função das doses utilizadas. O zinco é um elemento essencial e serve como catalisador enzimático ou participa de estruturas de proteínas e enzimas (PATZER et al., 1998). A análise dos transportadores de *Lxx* identificou a presença de ORFs homólogas aos genes *znuA* (*Lxx25040*), *znuB* (*Lxx25025*) e *znuC* (*Lxx20450*), que transcrevem para o sistema transportador de zinco. Em *E. coli* e *B. subtilis*, por exemplo, doses acima de 10 μ M e de 110 μ M são tóxicas, respectivamente (KASAHARA; ANRAKU, 1974; BEARD; HUGHES; POOLE, 1995), devido à

inibição da cadeia respiratória. O manganês interfere na transferência de elétrons na cadeia respiratória, impedindo assim a formação de ATP (BELIAEV; SAFFARINI, 1998). Outra hipótese é que altas doses de zinco e manganês têm efeitos deletérios na absorção de ferro, visto que estes metais competem por sítios de ligação no citoplasma bacteriano (BELIAEV; SAFFARINI, 1998). Acredita-se que *Lxx* possa utilizar manganês, visto que as ORFs homólogas aos genes de transporte estão intactos e enzimas que necessitam de manganês, como a superóxido dismutase dependente de manganês – *Mn-SOD* (*Lxx11510*) estão presentes em *Lxx*, sendo necessário um ensaio de dose-resposta para se encontrar uma dosagem não tóxica deste elemento. Já o cobalto é um importante metal para a síntese de cobalamina, importante cofator de inúmeras reações fisiológicas (ROTH et al., 1993). O efeito tóxico deste elemento em sua forma inorgânica pode ser devida à sua maior reatividade. Acreditava-se que este efeito não fosse ocorrer, visto que em muitas bactérias o acúmulo de alguns metais, inclusive o cobalto, é comum. Em *Lxx*, este acúmulo poderia estar relacionado com a presença de uma ORF homóloga ao gene da família *corA* (*Lxx4580*), que é transcrito para proteína de transporte de metais, que é responsável pelo transporte de diversos metais inclusive do cobalto (RODIONOV et al., 2003) e do sistema de transporte de cobalto, representado em *Lxx* pelas ORFs *Lxx14220*, *Lxx20920*, *Lxx21870* e *Lxx24470*, as quais são homólogas aos genes: transportador do tipo ABC de cobalto, permeases e bombas de fluxo de cobalto/zinco, respectivamente (ROTH et al., 1993). Ao mesmo tempo, porém, esse acúmulo rápido causado por esse sistema faz com que haja a necessidade de transformação da grande quantidade de cobalto reativo para forma não reativa, através da proteína transcrita pelo gene nitrilo hidratase dependente de cobalto, que está ausente em *Lxx*. Assim, a ausência deste gene pode levar a um acúmulo de cobalto na forma reativa, possivelmente resultando em toxidez (RODIONOV et al., 2003).

Figura 8 – Curvas de resposta a fontes de metais no meio de cultura da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, a cultura foi iniciada com 1%(v/v) de um pré-inóculo com DO=0,109. Barras verticais correspondem ao desvio padrão calculado com base nos valores de leituras de três tubos

2.3.2.5 Nutrientes combinados

Na análise de nutrientes combinados, utilizaram-se os que apresentaram melhores resultados nos testes individuais, sendo que como fonte de carbono optou-se por manter a glicose, haja vista que nenhuma outra fonte apresentou melhor resultado. Como fonte de ferro manteve-se a fonte de ferro tipo heme, no caso, a hemina bovina. Já nas fontes de vitaminas, optou-se pela adição das vitaminas tiamina e biotina. Com relação a metionina, optou-se por um incremento de 0,5 g/L para 1g/L deste aminoácido com base nos resultados do experimento de dose- resposta descrita no item 2.2.3.1. Utilizando-se da combinação destes nutrientes, obteve-se um meio de cultura no qual o crescimento de *Lxx* foi, em média, 30% superior ao seu crescimento no meio de cultura padrão M-SC modificado (Figura 9). Baseado neste resultado, propõe-se uma nova

composição ao meio de cultura para *Lxx*, o qual será denominado “M-SC otimizado”, tendo em sua composição, para 1 litro de meio, os seguintes compostos: 8 g de peptona de soja; 30 mL de solução 0,1% de hemina bovina - Sigma Tipo I em NaOH 0,05N; 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 13 mL de K_2HPO_4 (0,1M); 87 mL de KH_2PO_4 (0,1 M) e 800 mL de água destilada deionizada. Após a mistura destes componentes, o pH deve ser ajustado para 7,5 com NaOH e autoclavado. Após a autoclavagem, deve-se acrescentar 100 mL de uma solução contendo 5 g/L glicose; 0,5 g/L cisteína; 1 g/L metionina; 2,0 g/L albumina bovina – Fração V; 0,01g/L de D-biotina e 0,01 g/L de cloreto de tiamina.

Figura 9 - Curvas de resposta aos componentes combinados no meio de cultura da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. A cultura foi iniciada com 1% (v/v) de um pré-inóculo com OD=0,112. Barras verticais correspondem ao desvio padrão calculado com base nos valores de leituras de três tubos

2.3.3 Expressão gênica de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na presença de metionina

2.2.3.1 Curva de dose-resposta a metionina no crescimento de *Lxx*

Monteiro-Vitorello et al (2004) mostraram que a adição de metionina ao meio de cultura resulta num aumento na taxa de crescimento de *Lxx*. Tomando com base esta informação, estabeleceu-se uma curva de resposta a diferentes doses deste aminoácido a fim de determinar a melhor dose resposta a ser utilizada no experimento de expressão gênica diferencial. Na figura 10 podemos observar uma resposta positiva de *Lxx* à adição de 1,0 g e 0,5 g de metionina, confirmando os resultados de Monteiro-Vitorello et al. (2004). No entanto, quando a dose foi elevada para 1,5g/L, verificou-se uma acentuada queda na taxa de crescimento (Figura 10). Este resultado mostra que há um limite na suplementação com metionina, que possivelmente esteja ligado a um excesso na liberação do radical do grupo metil pela metionina, e provavelmente também pela liberação de resíduo de amônia e enxofre ao meio, alterando assim o potencial osmótico e o pH do meio de cultura (FULLER; CHANG; POTTER, 1967; OKE, 1978).

Figura 10 – Curvas de resposta a doses de metionina no meio de cultura da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, a cultura foi iniciada com 1%(v/v) de um pré-inóculo com DO=0,102. Barras verticais correspondem ao desvio padrão calculado com base nos valores de leituras de três tubos

2.3.3.2 Experimento de expressão gênica

Para o experimento de expressão gênica relacionada ao crescimento na presença (T1) e ausência (T0) de metionina, culturas de *Lxx* foram incubadas inicialmente em meio sem o suplemento de metionina por 6 dias, quando o tratamento T1 foi suplementado com 1g/L de metionina e o tratamento T0 com o mesmo volume de água, a DO da cultura neste momento era de 0,15. Vinte e quatro horas após a DO da cultura foi novamente medida, chegando a 0,2 no T0 e 0,35 no T1 (Figura 11). Após a leitura, procedeu-se a extração de RNA.

Figura 11 – Curvas de crescimento de *Lxx*. Círculos vazios correspondem ao T0 – tratamento sem acréscimo de metionina; círculos cheios correspondem ao T1 – tratamento com acréscimo de 1g/L de metionina. O ponto A mostra o momento de acréscimo de metionina e o ponto B o momento de extração de RNA das culturas bacterianas

2.3.3.3 Extração de RNA para Microarranjo

As modificações no protocolo de Bowtell e Sambrook (2002) para extração de RNA, juntamente com o processo adicional de purificação do mesmo utilizando coluna purificadora apresentaram ótimos resultados. Verificou-se a qualidade e quantidade de RNA obtido utilizando-se de espectrofotometria, a qual revelou uma concentração de 896 ng/μL para T1 e 763 ng/μL para T0. A eficiência do método de purificação de RNA foi comprovada através de PCR utilizando-se “primers” universais para a região 16S, sendo que não se observou amplificação de nenhum fragmento na amostra de RNA, comprovando assim a ausência de DNA (dados não apresentados).

2.3.3.4 Síntese e marcação de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se o fluoróforo Cy3 para marcar T0 e o Cy5 para marcar T1. A confirmação da incorporação dos fluoróforos foi feita por meio de espectrofotometria, efetuando-se uma varredura de 250 nm a 750 nm. Dois picos de absorbância foram detectados na faixa de 550 nm e 650 nm, que correspondem às emissões dos fluoróforos Cy3 e Cy5, respectivamente (dados não apresentados).

Esperava-se obter uma incorporação de 10 pmol/μl, incorporação esta considerada satisfatória (Nunes L.R., comunicação pessoal), mas obteve-se uma incorporação de 5,7 pmol/μl para Cy3 e 7,8 para Cy5 (dados não apresentados). Acredita-se que este nível de incorporação um pouco abaixo da satisfatória deve-se ao alto conteúdo de CG do genoma de *Lxx*, que é de aproximadamente 67%. Sendo assim, julga-se que seja necessária uma maior quantidade de fluoróforos para se efetuar a marcação de uma mesma massa de RNA comumente utilizada para a marcação de outros organismos.

2.3.3.5 Obtenção da imagem e análise

Após a hibridização, a imagem da lâmina foi capturada em aparelho GMS418 *ArrayScanner Genetic Microsystems/Affimetrix*, em dois canais diferentes, sendo o primeiro na frequência de 550 nm, para captação do sinal do fluoróforo Cy3-dCTP, e o segundo na frequência de 650 nm, para a captação do sinal do fluoróforo Cy5-dCTP. Ambas as leituras foram efetuadas com índice de ganho de 85%, sendo este o melhor valor encontrado para se evitar a influência de “background” nas imagens.

As imagens foram analisadas no programa SpotFinder 3.10 do pacote TM4, sendo que após a sobreposição do gradil, obteve-se os sinais dos genes impressos que sofreram hibridização por cada quadrante. Na análise da eficiência da recuperação dos valores de incidência para cada canal analisado, obteve-se uma qualidade média de 95,4 %. Após a obtenção dos valores de intensidade de ambos os canais, os dados foram normalizados pelo método LOWESS, gerando assim a visão completa da intensidade do sinal de cada gene impresso (Figura 12).

Na análise estatística efetuada pelo método SAM (Significal Analysis of Microarray) obteve-se uma lista completa dos genes que apresentaram expressão significativamente diferencial, considerando-se um valor da razão de expressão de $\text{Log}_2(R') = 3,00$, que corresponde a uma expressão ou supressão em valores absolutos reais de 8 vezes de um gene, seja ela positiva ou negativa. Com isso, obteve-se um valor de falsa descoberta de 0,003 genes/1000 genes.

Após a análise SAM, foi possível observar a distribuição do valor da intensidade pela razão de expressão de cada gene impresso na lâmina (Figura 13A), e também analisar a distribuição do número de genes presentes em cada faixa da razão da expressão, que se apresentou como uma distribuição normal (Figura 13B), resultado este já esperado (WAGNER et al., 2003).

Figura 12 – Visão geral da intensidade dos sinais dos genes impressos que foram hibridizados, já normalizados. A cor verde dentro do retângulo corresponde ao valor de intensidade do controle (T0) (Cy3) e a cor vermelha corresponde ao valor de intensidade do tratamento com metionina 1g/L (T1) (Cy5). Retângulos cinzas são dados perdidos. Figura A corresponde a repetição 1, e a figura B corresponde a repetição 2

Figura 13 – Distribuição dos sinais dos genes impressos após normalização. A. Relação entre soma da intensidade dos sinais dos genes e razão da intensidade dos sinais, mostrando a dispersão dos sinais dos genes. B. Distribuição da razão de expressão, onde se observa distribuição normal

2.3.3.6 Expressão gênica global de *Lxx*

A análise da expressão gênica de *Lxx*, quando cultivada na presença de metionina, permitiu identificar 114 genes com expressão alterada relativa ao tratamento T0, o que corresponde a 4,9% do total de genes preditos para este organismo. Destes, 93 foram regulados positivamente e 19 negativamente. Estes foram classificados dentro de categorias funcionais (Tabela 4, Anexo A).

Tabela 4– Número de genes que foram diferencialmente expressos dentro de cada categoria funcional, apresentando o número total e o número por regulação, se positiva ou negativa

Categoria	Total	Regulação negativa	Regulação positiva
Metabolismo de sacarídeos, pequenas moléculas e lipídeos.	4	0	4
Metabolismo intermediário (Carbono, fosfato e enxofre)	3	0	3
Metabolismo de energia	4	0	4
Sistema de regulação	7	2	5
Biosíntese de aminoácidos	2	0	1
Biosíntese de nucleotídeos	2	0	1
Biosíntese de cofator e grupos prostéticos	7	0	7
Biosíntese de ácido fosfático e ácidos graxos	1	1	0
Metabolismo de DNA	9	0	9
Metabolismo de RNA	12	2	10
Metabolismo de proteína	8	2	6
Estrutura celular	7	2	5
Transporte celular	10	2	8
Divisão celular	1	0	1
Elementos genéticos móveis	6	1	5
Patogenicidade e virulência	2	0	2
Adaptação a condições atípicas	1	1	0
Proteínas hipotéticas	23	6	17
Categoria indefinida	5	0	5
Total	114	19	93

2.3.3.7 Expressão de genes do metabolismo central

O efeito positivo da metionina sobre o crescimento de *Lxx* foi acompanhado de um aumento na expressão gênica de 5 genes dos 54 genes que transcrevem para proteínas ribossomais, assim como de 14 genes relacionados ao metabolismo de DNA, RNA e síntese protéica.

Um crescimento celular mais acelerado exige maior expressão de genes relacionados à estrutura e processos celulares, o que está de acordo com a regulação positiva de 14 genes responsáveis por componentes de membrana, divisão celular e sistemas de transporte, assim como de 7 genes relacionados a fatores de regulação, sendo estes envolvidos na regulação, transcrição e replicação do DNA e produção de pirimidinas e purinas. Outro evento observado e que pode ser correlacionado com o maior crescimento de *Lxx* e conseqüentemente com a maior replicação de seu DNA, é a maior expressão de genes relacionados com o sistema de reparo de DNA, sendo observada uma regulação positiva de 9 genes. Esta maior ativação deve-se possivelmente à necessidade de maior prevenção contra eventuais erros de replicação de seu DNA genômico durante um crescimento acelerado (Anexo B).

Com a maior necessidade da síntese protéica, replicação e transcrição do material genético, observou-se também a maior expressão de genes de síntese de nucleotídeos e aminoácidos, assim como a maior atividade protéica e enzimática no metabolismo de *Lxx* que pode ser depreendida a partir da maior expressão de genes relacionados a vitaminas, cofatores e grupos prostéticos, ligados aos metabolismos de ácido fólico, pantotenato, piridoxina e riboflavina, assim como porfírina, sendo esta relacionada ao metabolismo de ferro do tipo heme. Esta verificação salienta, ainda mais, a idéia de que o aumento no de crescimento de *Lxx* na presença de metionina, está relacionado a uma maior expressão de genes de seu metabolismo central (Anexo B).

Uma maior taxa de crescimento e maior expressão gênica faz supor uma maior necessidade de carbono e energia, fato observado a partir da regulação positiva de 18 genes relacionados às rotas da glicólise, gliconeogênese e pentose, assim como da rota relacionada à degradação de lipopolissacarídeos (Anexo B).

Também verificou-se a expressão de genes positivamente relacionados à respiração aeróbia, como a ORF *Lxx*15040, que apresenta homologia ao genes que transcreve para a

subunidade I do citocromo C oxidase e gene relacionado a respiração anaeróbia, como a ORF *Lxx22610*, homologa ao gene que transcreve para álcool desidrogenase, enzima importante na oxidação de moléculas como, por exemplo, etanol em acetoaldeído na presença de NAD:zinco. A expressão deste gene é relacionada ao metabolismo do acetato em *E.coli* quando cultivada em meio rico, sendo relacionado com um excesso de metabolismo de glicose, levando a um acúmulo de piruvato na fase exponencial. Este piruvato acumulado é oxidado em acetato causando assim uma regulação do sistema (TAO et al., 1999). Pôde-se observar também a maior regulação de ORFs homólogas a transportadores de elétrons, como a ORF *Lxx9420*, que é homóloga ao gene que transcreve para oxigenase dependente de FAD, enzima diretamente envolvida também com a síntese de peptidioglicano da membrana celular. Salienta-se ainda a regulação positiva da ORF *Lxx30*, homóloga ao gene que transcreve para dehidrogenase 6-fosfogluconato, importante enzima que atua junto com a glucose 6 fosfato na quebra da glicose e da ORF *Lxx770*, homóloga a gene relacionado à degradação de lipopolissacarídeos (Anexo B).

2.3.3.8 Metabolismo de metionina

A análise da expressão das ORFs homólogas a genes da via metabólica da metionina revelou 5 ORFs com expressão diferencial (Tabela 5); *Lxx11170*, *Lxx5300*, *Lxx11150*, *Lxx23940* e *Lxx10590*.

A ORF *Lxx10590* é homóloga ao gene que transcreve para O-acetilhomoserina (tiol)-liase, enzima importante na produção de homocisteína a partir de homoserina (Tabela 5), tendo como um subproduto desta reação a produção de amônia, produto este que pode ser utilizado no metabolismo de nitrogênio (PINTO et al., 2004).

A ORF *Lxx11170* é homóloga ao gene que transcreve para metionil-tRNA formiltransferase (MTF), uma importante enzima que participa da transformação de metionil-tRNA para formilmetionil-tRNA, importante reação na síntese de proteína (GRUNBERG-MANOGO, 1996; KOZAK, 1983) (Tabela 5). Guillon et al. (1992) relatam que a ruptura do gene MTF em *E. coli* leva a um crescimento lento, evidenciando assim sua importância na síntese de proteínas e no crescimento celular.

A ORF *Lxx5300* é homóloga ao gene que transcreve para adenosilhomocisteinase (*ahcY*), enzima responsável pela hidrólise reversível do S-adenosil-L-homocisteína para adenosina e L-homocisteína, na ausência de cofator (PALMER; ABELES, 1979). Este processo fornece, em determinadas situações, fontes de homocisteína a partir de resíduos de metionina provenientes da degradação de proteínas (PALMER; ABELES, 1979).

A ORF é *Lxx11150* homóloga ao gene que é transcrito para S-adenosilmetionina sintetase, *metK*. Esta enzima atua na metilação do DNA e no sistema de sinalização celular, além de catalisar a reação de L-metionina na presença de ATP (Adenosina trifosfato), gerando assim S-adenosilmetionina (MARKHAN et al., 1984) (Tabela 5). Este composto atua como um regulador positivo para a produção de metabólitos secundários. Em *Streptomyces avermitilis*, por exemplo, este composto está relacionado a um aumento na produção de avermectina, importante antibiótico produzido por *S. avermitilis*. Em *Leishmania infartum*, por outro lado, observa-se a utilização de S-adenosilmetionina para a produção de poliaminas, tais como espermidina, espermina e putrescina, importantes compostos que atuam na patogenicidade deste organismo (REGUERA et al., 2002). S-adenosylmetinona também participa como composto secundário no metabolismo de biotina, ácido lipólico (EISEMBERG, 1987), biosíntese de arginina (GLANSDORFF, 1987) e no sistema de restrição e modificação de DNA (BICKLE, 1987) em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurim*. Em *Bacillus subtilis*, verificou-se que a super expressão deste gene resultou em alta concentração de S-adenosilmetionina e repressão da biosíntese de metionina (YOCUM et al., 1996). Esta constatação sinaliza que há a necessidade de uma regulação precisa deste gene para o crescimento bacteriano, pois a regulação positiva deste na presença de metionina, acompanhado do maior crescimento celular, é um indicativo de uma possível baixa ou nula produção de metionina por *Lxx*.

Tabela 5 – Expressão de genes relacionados com metabolismo de metionina em *Lxx*

ORF	Gene	Símbolo	Categoria	Expressão*	Situação
3230	Cystathionine gamma-synthase	<i>metB</i>	II.A.2	2,849	--
5300	Adenosylhomocysteinase	<i>ahcY</i>	I.B.10	3,304	Pseudogene
6870	Homoserine dehydrogenase	<i>metL</i>	II.A.2	0,875	--
6920	Serine O-acetyltransferase	<i>cysE</i>	II.A.3	0,198	--
6930	Cysteine synthase	<i>cysK</i>	II.A.3	1,253	Pseudogene
8580	Phosphoglycerate dehydrogenase	<i>serA</i>	II.A.3	-1,198	--
9470	Cysteine desulfurase	<i>csd</i>	II.A.3	0,815	--
10590	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	<i>cysD</i>	II.A.3	3,252	Pseudogene
11150	S-adenosylmethionine synthetase	<i>metK</i>	I.B.10	3,377	--
11170	Methionyl-tRNA formyltransferase	<i>MTF</i>	III.B.4	3,772	--
11750	Phosphoserine phosphatase	<i>SerB</i>	II.A.3	0,846	--
13140	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	<i>SerA</i>	II.A.3	2,257	--
14420	Cysteine desulfurase	<i>nifS</i>	II.A.3	0,755	--
15760	D-methionine transport system permease protein	<i>metI</i>	II.A.2	1,785	--
15770	D-methionine transport system ATP-binding protein	<i>metN</i>	II.A.2	1,459	--
15780	D-methionine transport system substrate-binding protein	<i>metQ</i>	II.A.2	2,132	--
15900	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	<i>metE</i>	II.A.2	1,948	Pseudogene
15930	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	<i>matF</i>	II.A.2	2,687	--
16520	Cysteine desulfurase	<i>iscS</i>	II.A.3	0,785	--
17520	Methionyl-tRNA synthetase	<i>metG</i>	III.B.4	2,373	--
17700	Cystathionine beta-synthase	<i>cysM</i>	II.A.3	2,961	--
17890	Phosphoserine aminotransferase	<i>serC</i>	II.A.3	2,249	--
18240	CysteinyI-tRNA synthetase	<i>cysS</i>	III.B.4	1,529	--
18640	Serine hydroxymethyltransferase	<i>glyA</i>	II.A.3	2,366	--
18930	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	<i>cysD</i>	II.A.3	2,814	--
18950	Homoserine o-acetyltransferase protein	<i>metA</i>	II.A.2	0,979	--
23940	DNA methyltransferase	<i>dam</i>	III.A.5	3,009	Pseudogene
24620	Sarcosine oxidase	<i>soxA</i>	II.A.3	2,426	Pseudogene

* Corresponde ao valor da razão em $\log_2$ das intensidades do tratamento (T1) pelo controle (T0)

Outra ORF que apresentou regulação positiva foi *Lxx23940*, homóloga ao gene que transcreve para DNA adenina metiltransferase (*dam*). Apesar desta estar anotada como um pseudogene, verifica-se que houve a transcrição desta ORF, fato este que evidencia que uma possível não funcionalidade pode ser verificada no processo de tradução para proteína, ou ainda na geração de uma proteína não funcional. Este gene transcreve para uma importante enzima que efetua a metilação da adenina no sistema de replicação de DNA, um processo crítico nas etapas

de replicação, transcrição e reparo do DNA por mutação (MODRICH, 1991) (Tabela 5). Em cepas de *E.coli* I mutantes para *dam*, observou-se a ocorrência de muitos erros durante o reparo na replicação do DNA, evento que acabou afetando a viabilidade desta cepa (MARINUS, 2000). A presença de uma única cópia deste gene e como um provável pseudogene, pela presença de um ponto de mutação, em *Lxx* pode explicar por que esta bactéria apresenta um número grande de pseudogenes, em torno de 13%, indicando assim que o grande número de pseudogenes não repousa somente sobre a grande frequência dos transposons no genoma da *Lxx*, mas também na presença de mutações em genes essenciais para o sistema de reparo de DNA, levando assim a um provável sistema de reparo deficiente, evento este que também ocorre na metilação do DNA, como no caso do DNA metiltransferase.

Dentre as utilizações indiretas da metionina, podemos salientar sua utilização como uma possível fonte de carbono através da utilização da rota do succinil-CoA, onde utilizando-se dos produtos das enzimas S-adenosilmetionina sintetase e adenosilhomocisteína, transcritas por genes homólogos as ORFs *Lxx11150* e *Lxx5300*, respectivamente, é possível a utilização da via da multiconversão de moléculas, que acabaria por resultar na rota do succinil-CoA, que é um subproduto do ciclo do ácido cítrico e que pode ser utilizado na rota da gliconeogênese. A regulação positiva desta ORFs, juntamente com a ORF *Lxx11610*, homóloga ao gene que transcreve para transaldolase, é uma possível indicação da utilização desta rota (VATTANAVIBOON et al., 2005; TSOLAS; HORECKER, 1973).

2.3.3.9 Metabolismo de nitrogênio

No metabolismo de nitrogênio, das 4 ORFs diferencialmente expressas, observamos o aumento da expressão em ORFs possivelmente relacionadas com a utilização de amônia (NH₄), subproduto da catálise da metionina, como a ORF *Lxx10580*, homóloga ao gene que transcreve para um transportador de amônia, e também a ORF *Lxx11330*, homóloga ao gene que transcreve para glutamato sintetase subunidade β. Ambas as ORFs estão relacionadas com a utilização da amônia, liberada pela catálise da metionina, sendo que esta amônia é transportada e metabolizada

para a forma de glutamina, produto inicial do metabolismo de nitrogênio, que irá fornecer produtos básicos para a formação de aminoácidos e nucleotídeos.

Este evento corrobora com relatos em *E. coli*, onde observou-se uma maior expressão e um maior número de genes expressos quando se substitui amônia por um aminoácido como fonte de nitrogênio, sendo esta a fonte de melhor utilização pela bactéria, visto o potencial tóxico da amônia (TAO et al., 1999). Este resultado sugere a possibilidade da utilização da metionina como fonte de nitrogênio por *Lxx*, visto que as outras fontes de nitrogênio presentes em seu meio de cultura são na maioria formas complexas, como peptona de soja, formas essas que, acredita-se, sejam de difícil metabolismo por uma bactéria que habita um ambiente restrito, como os vasos xilemáticos, local onde a possibilidade de se encontrar formas mais simples de fontes de nitrogênio, como aminoácidos, é bem maior. Esta argumentação pode explicar a fastidiosidade da *Lxx* em condições naturais, uma vez que estas formas de nitrogênio podem estar em baixa concentração no xilema da cana-de-açúcar.

2.3.3.10 Fatores de adaptação e elementos genéticos móveis

O crescimento de *Lxx* na presença de metionina resultou na regulação de 3 genes ligados a fatores de adaptação, sendo que 2 destes foram regulados positivamente e 1 negativamente. Dentre os regulados positivamente, destaca-se a ORF *Lxx*14447, homóloga ao gene que transcreve para para-aminobenzoato sintetase (*pabA*), composto que participa na produção do antibiótico candidicina. A maior expressão desta ORF pode indicar um aumento na competitividade da *Lxx* contra outros microorganismos na presença de um substrato mais rico. Outra importante ORF neste processo regulado positivamente foi a ORF *Lxx*16860 homóloga ao gene que transcreve para uma proteína da família da hemolisina III. Este gene transcreve para um importante fator de virulência que atua como uma toxina na formação de poros na membrana plasmática levando a um desbalanço celular, degradação de DNA e morte celular (KIM et al., 1998), sendo comum na interação planta-bactéria (HUTCHISON; GROSS, 1997), fungo-bactéria (HUTCHISON; JOHNSTONE, 1993) e animal-bactéria (HUTCHISON et al., 1998).

Em contrapartida, uma importante ORF regulada negativamente foi a ORF *Lxx*17310 homóloga ao gene que transcreve para a proteína A sensível à deficiência nutricional (starvation-

sensing protein A - *rpoS*). Em *E. coli*, Peterson et al. (2005) relataram maior expressão deste gene quando a bactéria foi exposta a condições de exaustão de carbono, nitrogênio e fósforo: verificou-se um aumento em sua expressão na condição de exaustão de carbono e fósforo, ao passo que na condição de exaustão de nitrogênio, observou-se um pequeno aumento no nível de expressão, porém uma maior atividade da proteína, indicando que a redução da expressão deste gene em *Lxx* cultivada na presença de metionina sinaliza para a supressão da necessidade nutricional da *Lxx* por carbono ou nitrogênio. Infelizmente, não é possível indicar qual das duas rotas de catálise, se a do carbono ou a do nitrogênio, foi favorecida, visto que ambas apresentaram genes regulados na presença de metionina.

Outros genes, pertencentes a outras categorias, mas que exercem grande influência na adaptação, são as conhecidas proteínas de choque térmico, cuja expressão é modulada por situações de mudança de ambiente além de participarem como fatores adicionais ao processo de infecção. Em *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo, a ruptura do gene que transcreve para proteínas chaperonas causou um importante impacto na virulência (STEWART et al., 2002). Em *Lxx*, observamos a regulação positiva de dois genes que transcrevem para chaperonas, *Lxx15555* e *Lxx19880*.

Dentre os genes relacionados aos elementos genéticos móveis, observamos a expressão diferencial em 6, sendo 5 positivamente e 1 negativamente. O único gene regulado negativamente, *Lxx23870*, transcreve para um regulador de transcrição de fago, que quando regulado positivamente reprime a expressão dos fagos e transposons e também efetua o controle de cópias de plasmídios bacterianos (FARUQUE; MEKALANOS, 2003; BOYCE; DAVIDSON; HILLIER, 1995). Em contrapartida, observou-se uma regulação positiva de genes de fagos e outros elementos, evento esperado a partir da repressão do regulador de fago. Três das cinco ORFs que foram reguladas positivamente são homólogas a genes que transcrevem para fagos, *Lxx3910*, *Lxx13040* e *Lxx23842*, sendo que estes apresentaram uma expressão 8 vezes maior no tratamento T1, em média. Outra duas ORFs que apresentaram regulação são homólogas aos genes que transcrevem para uma integrase (*Lxx8825*) e uma transposases (*Lxx3710*), que apresentaram, em média, uma expressão cinco vezes maior. Este grande aumento na expressão de genes de elementos genéticos móveis corrobora com a hipótese de decaimento genômico de *Lxx* (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2002), por meio de acúmulo de mutações, as quais são causadas na grande maioria pelos transposons.

2.3.3.11 Genes hipotéticos conservados e hipotéticos

Dos 2326 genes encontrados no genoma de *Lxx*, apenas 1373 deles (59%) possuem uma função conhecida, sendo que 279 são considerados pseudogenes e 674 genes (29%) são de função desconhecida. Dos 674 genes de função desconhecida, observou-se a regulação de 23 destes genes quando *Lxx* é cultivada na presença de metionina, ou seja, 20,3% dos genes que apresentam uma regulação significativa ainda não são conhecidos pela ciência (Anexo B).

Dentre os 23 genes, observamos que 17 genes apresentam uma regulação positiva, com uma expressão média superior de 7 vezes e os 6 genes regulados negativamente apresentam uma supressão média de - 4,5 vezes (Anexo B).

3 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que:

A – A adição de 0,01 g/L de biotina, 0,01 g/L de tiamina e 1 g/L de metionina ao meio de cultura resultou num aumento na taxa de crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* *in vitro*.

B – A fastidiosidade do crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* foi, em parte, explicada pelas deficiências em vias metabólicas essenciais ao crescimento.

C – O teste de utilização de nutrientes é uma forma simples e bem indicada para se testar a anotação genômica de vias metabólicas.

D – A adição de 1 g/L de metionina ao meio de cultura faz com que 4,9 % dos genes da *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* sejam regulados, sendo que 95 genes são regulados positivamente e 14 genes o são negativamente.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, S.C. Iron storage in bacteria. **Advances in Microbiology Physiology**, London, v.40, p.281-351, 1998.
- BEARD, S.J.; HUGHES, M.N.; POOLE, R.K. Inhibition of the cytochrome bd-terminated NADH oxidase system in *Escherichia coli* K-12 by divalent metal cations. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v.131, p.205-210, 1995.
- BELIAEV, A.S.; SAFFARINI, D.A. *Shewanella putrefaciens* mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.6292-6297, 1998.
- BEHR, M.A.; WILSON, M.A.; GILL, W.P.; SALAMON, H.; SCHOOLNIK, G.K.; RANE, S. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. **Science**, Washington, v.284, p. 1520-1523, 1999.
- BELIAEV, A.; SAFFARINI, D. *Shewanella putrefaciens* mtrB encodes an outer membrane protein required for Fe(III) and Mn(IV) reduction. **Journal Bacteriology**, Washington, v.181, p.6292-6297, 1998.
- BLANCO, J.; COQUE, J.J.R.; MARTÍN, J.F. The folate branch of the methionine biosynthesis pathway in *Streptomyces lividans*: disruption of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene leads to methionine auxotrophy. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.1586-1591, 1998.
- BICKLE, T.A. DNA restriction and modification systems. In NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF W.S.; RILEY M.; SCHAECHTER M.; UMBARGER, H.E. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**, 2nd ed. Washington: ASM Press, 1987. p.427-458.
- BIVILLE, F.; OSHIMA, T.; MORI, H.; KAWAGOE, Y.; BOUVET, O.; RAGER, M.; PERROTTE-PIQUEMAL, M.; DANCHINA, A. *Escherichia coli* response to Exogenous Pyrophosphate and Analogs. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Basel, v.5, p.37-45, 2003.
- BOWTELL, D.; SAMBROOK, J. **DNA microarray: A molecular cloning manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003, p.452-824.
- BOYCE, J.D.; DAVIDSON, B.E.; HILLIER, A.J. Identification of prophage genes expressed in lysogens of the *Lactococcus lactis* bacteriophage BK5-T. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4099-4104, 1995.

- CAMPANHARO, J.C.; LEMOS, M.V.F.; LEMOS, E.G. DE M. Growth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Current Microbiology**, New York, v.46, p.99–102, 2003.
- CARDOSO, C.O.N. Isolamento da bactéria do raquitismo (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) no Brasil. **Boletim Técnico COPERSUCAR**, Piracicaba, v.34, p.48-52, 1986.
- CHAGAS, P.R.R.; MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo da soqueira. **Brasil Açucareiro**, Piracicaba, v.106, p.40-44, 1988.
- CHALKLEY, L.J.; KOORNHOF, H.J. antimicrobial activity of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* determined by the killing curve method: antibiotic comparisons and synergistic interactions. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v.28, p.331-342, 1985.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília, Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/indicadores/0301-produtividade-brasileira.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2005.
- COX, C. D. Iron uptake with ferripyochelin and ferric citrate by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.142, p.581-587, 1980.
- CLEVELAND, W.S. Robust locally locally weighted regression smoothing scatterplots. **Journal of the American Statistical Association**, New York, v.74, p.829-836, 1979.
- CROSA, J.H.; WALSH, C.T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.66, p.223-249, 2002.
- DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; HARRIS, R.W.; LAWSON, R.H. Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v.210, p.1365-1367, 1980.
- DAVIS, M. J.; GILLASPIE, A. G.; VIDAVER, A. K.; HARRIS, R. W. *Clavibacter*: A new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov.; subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov.; pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.107-117, 1984.
- DAVIS, M.J.; DEAN, J.L. Comparison of diagnostic techniques for determining incidence of ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, p.896-899, 1984.
- DANCHIN, A.; SEKOWSKA, AGNIESZKA. Expression profiling in reference bacteria: dreams and reality. **Genome Biology**, London, v.1, p.1024.1-1024.5, 2000.
- DERISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**, Washington, v.278, p.680-686, 1997.

DOMINGUEZ, H.; ROLLIN, C.; GUYONVARCH, A.; GUERQUIN-KERN, J.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; LINDLEY, N.D. Carbon-flux distribution in the central metabolic pathways of *Corynebacterium glutamicum* during growth on fructose. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.254, p.96-102, 1998.

EISENBERG, MA. Biosynthesis of biotin and lipoic acid. In NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF W.S.; RILEY M.; SCHAECHTER M.; UMBARGER, H.E. (Ed.). ***Escherichia coli and Salmonella***: cellular and molecular biology, 2nd ed. Washington: ASM Press, 1987, p.502-581.

EVTUSHENKO, L.I.; DOROFEEVA, L.V.; SUBBOTIN, S.A.; COLE, J.R.; TIEDJE, J.M. *Leifsonia poae* gen. nov.; sp. nov.; isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of *Corynebacterium aquaticum* leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.50, p.371-380, 2000.

FARUQUE, S.M.; MEKALANOS, J.J. Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. **TRENDS in Microbiology**, Cambridge, v.11, p.505-510, 2003.

FEGAN M.; CROFT B.J.; TEAKLE D.S.; HAYWARD A.C.; SMITH G.R. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, Saint Paul, v.47, p.495-504, 2003.

FRODYMA, M.E.; DOWNS, D. ApbA, the ketopantoate reductase enzyme of *Salmonella typhimurium* is required for the synthesis of thiamine via the alternative pyrimidine biosynthetic pathway. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.273, p.5572-5576, 1998.

FULLER, H.L.; CHANG, S.I.; POTTER, D.K. Detoxication of dietary tannic acid by chicks. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.91, p.477-481, 1967.

GIGLIOTE, E. A. RSD impact on sugar industries - Brazil In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7, 1998. Edimburg: Anais. Edinburg: s.ed., 1998, p.9-10.

GILLESPIE, D.; SPIEGELMAN, S.A. quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. **Journal of Molecular Biology**, London, v.12, p.829-842, 1965.

GILLASPIE JUNIOR, A.G.; TEAKLE, D. S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE JUNIOR, A.G. **Disease of sugarcane**: major disease. Amsterdam: Elsevier Science, 1989, p.59-80.

GLANSDORFF, N. Biosynthesis of arginin. In NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF W.S.; RILEY M.; SCHAECHTER M.; UMBARGER, H.E. (Ed.). ***Escherichia coli and Salmonella***: cellular and molecular biology, 2nd ed. Washington: ASM Press, 1987, p.583-621.

GUILLON, J.M.; MECHULAM, Y.; SCHMITTER, J.M.; BLANQUET, S.; FAYAT, G. Disruption of the gene for Met-tRNA(fMet) formyltransferase severely impairs growth of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.4294–4301, 1992.

GREENE, R.C. Biosynthesis of methionine. In NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF W.S.; RILEY M.; SCHAECHTER M.; UMBARGER, H.E. (Ed.). *Escherichia coli and Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. Washington: ASM Press, 1987, p.1458-1496.

GRUNBERG-MANAGO, M. Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors. In NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF W.S.; RILEY M.; SCHAECHTER M.; UMBARGER, H.E. (Ed.). *Escherichia coli and Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. Washington: ASM Press, 1987, p.1432-1457.

HAAPALAINEN, M.; MATTINEN, J.; METZLER, M. C. The growth of a plant-parasitic bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, is enhanced by xylem fluid components. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.56, p.147-155. 2000.

HAYASHI, M.; OHNISHI, J.; MITSUHASHI, S.; YONETANI, Y.; HASHIMOTO, S.; IKEDA, MASATO. Transcriptome analysis reveals global expression changes in an industrial L-lisina producer of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.70, p.546-550, 2006.

HENDERSON, D.P.; PAYNE, S.M. *Vibrio cholerae* iron transport systems: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, p.5120-5125, 1994.

HUTCHISON, M. L.; JOHNSTONE, K. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. **Physiologic and Molecular Plant Pathology**, London, v.42, p.373-384, 1993.

HUTCHISON, M.L.; GROSS, D.C. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.10, p.347-354, 1997.

HUTCHISON, M.L.; POXTON, I.R.; GOVAN, J.R.W. *Burkholderia cepacia* produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes. **Infection and Immunity**, Washington, v.66, p.2033-2039, 1998.

JAMES G. A review of ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, Tunbridge Wells, v.98, p.532-541, 1996.

LAMANNA, C.; MALLETE, M.F.; ZIMMERMAN, L.N. **Basic bacteriology**: its biological and chemical background. Baltimore; Williams & Wilkins edit., 1973, p.1149.

LANGE, C.; RITTMANN, D.; WENDISCH, V.F.; BOTT, M.; SAHM, H. Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, p.2521-2532, 2003.

LANDER, E.S. The new genomics: global view of biology. **Science**, Washington, v.274, p.536-539, 1996.

LEE, I. M.; BARTOSZYK, I. M.; GUNDERSEN-RINDAL; D. E.; DAVIS, R. E. Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.2631-2636, 1997.

LEIFSON, E. The bacterial flora of distilled and stored water.III. New species of the genera *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Spirillum* and *Pseudomonas*. **Institution Bulletin Bacteriological Nomenclature Taxonomy**, Edinburgh, v.12, p. 161–170, 1962.

LEMOES, E.G.M.; ALVES,M.C.; CAMPANHARO, J.C. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letter**, Amesterdan, v.219 p.39–54, 2003.

LEUNG, K.P.; FOLK, S.P. Effects of porphyrins and inorganic iron on the growth of *Prevotella intermedia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amesterdan, v.209, p.15-21, 2002.

LEUNG YF, CAVALIERI D. Fundamentals of cDNA microarray analysis. **Trends Genetics**, Cambridge, v.19, p.649-659, 2003.

LIAO, C.H.; CHEN, T.A. Isolation, culture, and pathogenicity to Sudan grass of *Corynebacterium* associated with ratoon stunting of sugarcane and with bermuda grass. **The American Phytopathological Society**, Saint Paul, v.71, p.1303-1306, 1981.

LÓPEZ-MILLÁN, A.F.; MORALES, F.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. implications for iron and carbon transport. **Plant Physiology**, Washington, v.124, p.873-884, 2000.

MARINUS, M.G. Recombination is essential for viability of an *Escherichia coli* dam (DNA Adenine Methyltransferase) mutant. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, p.463-468, 2000.

MODRICH, P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.25, p.229-253, 1991.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.A.; van SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; AMARAL, A.M. do; HARAKAVA, R.; FRANCO, J.C.; WOOD, D.; OLIVEIRA, M.C. de; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; SILVA, A.C.R. da; FURLAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIDA JUNIOR, N.F.; CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; E-DORRY, H.A.; FERRO, M.I.T.; GAGLIARDI, P.R.; GIGLIOTI, E.; GOLDMAN, M.H.S.; GOLDMAN, G.H.; KIMURA, E.T.; FERRO, E.S.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; MAURO, S.M.Z.; MACHADO, M.A.; MARINO, C.L.; MENCK, C.F.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; SIQUEIRA, W.; SOUZA, A.A. de; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.G.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. The genome sequence of the Gram-positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.17, p.827-836, 2004.

NITSCH, J.P.; NITSCH, C. Haploid plants from pollen grains. **Science**, Washington, v.163, p.85-87, 1969.

NUBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p.5636–5643, 1996.

PALMER, J.L.; ABELES, R.H. The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.254, p.1217–1226, 1979.

PATZER, S.I.; HANTKE, K. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, v.28, p.1199–1210, 1998.

PATTERSON, J.H.; WALLER, R.F.; JEEVARAJAH, D.; BILLMAN, H.J.; McCONVILLE, M. J. Mannose metabolism is required for mycobacterial growth. **Biochemical Journal**, London, v.372, p.77–86, 2003.

PETERSON, C.N.; MANDEL, M.J.; SILHAVY, T.J. *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. **Journal Bacteriological**, Washington, v.187, p.7549-7553, 2005.

PINTO, R.; TANG, Q.X.; BRITTON, W.J.; LEYH, T.S.; TRICCAS, J.A. The *Mycobacterium tuberculosis* *cysD* and *cysNC* genes form a stress-induced operon that encodes a tri-functional sulfate-activating complex. **Microbiology**, New York, v.150, p.1681-1686, 2004.

OH, M.; LARS, R.; KATY, C.K.; JAMES, C. Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.277, p.13175–13183, 2002.

OKINAKA, Y.; YANG, C.; PERNA, N.T.; KEEN, N.T. Microarray profiling of *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes that area regulated during plant infection. **Molecular plant microbe interaction**, Saint Paul, v.15, p.619-629, 2002.

OKE, O.L. Problems in the use of cassava as animal feed. **Animal Science and Technology**, Tokyo, v.3, p.345-380, 1978.

- KASAHARA, M.; ANRAKU, Y. Transport of sugars and amino acids in bacteria: XI. mechanism of energy coupling reaction for the concentrative uptake of proline by *Escherichia coli* membrane vesicles. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.76, p.977-983, 1974.
- KEENER, J.; NOMURA, M. Regulation of ribosome synthesis. In NEIDHARDT, F.C.; CURTISS III, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF W.S.; RILEY M.; SCHAECHTER M.; UMBARGER, H.E. (Ed.), ***Escherichia coli and Salmonella*: cellular and molecular biology**, 2nd ed. Washington: ASM Press, 1987, p.1225-1325.
- KIM, J.F.; HAM, J.H.; BAUER, D.W.; COLLMER, A.; BEER, S.V. The hrpC and hrpN operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by plcA and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.11, p.563-567, 1998.
- RAGO, A.M.; ACRECHE, M.M.; SOPENA, R.A.; MARIOTTI, J.A. A survey of ratoon stunting disease (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) in commercial sugarcane fields at Tucumán (Argentina). **Sugar cane International**, Buenos Aires, v.22, p.12-33, 2004.
- REGUERA, R.M.; BALAÑA-FOUCE, R.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; FERNÁNDEZ, F.J.; GARCÍA-ESTRADA, C.; CUBRÍA, J.C.; ORDÓÑEZ, C.; ORDÓÑEZ, D. Cloning expression and characterization of methionine adenosyltransferase in *Leishmania infantum* promastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.277, p.3158-3167, 2002.
- REDDY, G. S. N.; PRAKASH, J. S. S.; SRINIVAS, R.; MATSUMOTO, G. I. AND SHIVAJI, S. *Leifsonia rubra* sp. nov. and *Leifsonia aurea* sp. nov.; psychrophiles from a pond in Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v.53, p.977-984, 2003.
- RENESTO, P.; CRAPOULET, N.; OGATA, H.; SCOLA, B. la; VESTRIS, G.; CLAVERIA, J.; RAOULT, D.. Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whipplei*. **Lancet**, London, v.362, p.447-449, 2003.
- RODIONOV, D.A.; VITRESCHAK, A.G.; MIRONOV, A.A.; GELFAND, M.S. Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.278, p.41148-41159, 2003.
- ROMANO, A.H.; CONWAY, T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. **Research in Microbiology**, Paris, v.147, p.448-55, 1996.
- ROTH, J.R.; LAWRENCE, J.G.; RUBENFIELD, M.; KIEFFER-HIGGINS, S.; CHURCH, G.M. Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. **Journal Bacteriology**, Washington, v.175, p.3303-3316, 1993.

SAEED, A.I.; SHAROV, V.; WHITE, J.; LI, J.; LIANG, W.; BHAGABATI, N.; BRAISTED, J.; KLAPA, M.; CURRIER, T.; THIAGARAJAN, M.; STURN, A.; SNUFFIN, M.; REZANTSEV, A.; POPOV, D.; RYLTSOV, A.; KOSTUKOVICH, E.; BORISOVSKY, I.; LIU, Z.; VINSAVICH, A.; TRUSH, V.; QUACKENBUSH, J. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **Biotechniques**, Natick, v.34, p.374-378, 2003.

SANGUINO, A. Diagnóstico e controle do raquitismo da soqueira causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.17, p.26. 1998.

SAVLI, H.; KARADENIZLI, A.; KOLAYLI, F.; GUNDES, S.; OZBEK, U.; VAHABOGLU, H. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.52, p.403-408, 2003.

SMOOT, L.M.; SMOOT, J.C.; GRAHAM, M.R.; SOMEVILLE, G.A.; STURDEVANT, E.D.; MIGLIACIO, C.A.L.; SYLVA, G.L.; MUSSER, J.M. Global differential gene expression in response to growth temperature alteration in group A *Streptococcus*. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v.98, p.10416-10421, 2001.

STEWART, G.R.; WERNISCH, L.; STABLER, R.; MANGAN, J.A.; HINDS, J.; LAING, K.G.; YOUNG, D.B.; BUTCHER, P.D. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. **Microbiology**, New York, v.148, p.3129-3138, 2002.

SCHMITT, M.P. Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.179, p.838-845, 1997.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v.98, p.503-517, 1975.

SUZUKI, K.; SUZUKI, M.; SASAKI, J.; PARK, Y. H.; KOMAGATA, K. *Leifsonia* gen. nov., a genus for 2,4-diaminobutyric acid-containing actinomycetes to accommodate *Corynebacterium aquaticum* Leifson 1962 and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* Davis et al.1984. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.45, p.253-262. 1999.

TAI, S.S.; LEE, C.J.; WINTER, R.E. Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, Washington, v.61, p.5401-5405, 1993.

TAO, H.; BAUSCH, C.; RICHMOND, C.; BLATTNER, F.R.; and CONWAY. T. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, p.6425-6440, 1999.

TEAKLE, D.S.; RYAN, C.C. The effect of high temperature on the sugar cane ratoon stunting disease bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, *in vitro* and *in vivo*. **Sugar Cane**, High Wycombe, v.6, p.5-6, 1992.

TEAKLE DS; SMITH PM; STEINDL DRL. Association of a small corynebacterium with the ratoon stunting disease of sugarcane. **Australian Journal of Agriculture Research**, Victoria, v.24, p.869-874, 1973.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, A.L.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997, v.2, p.207-225.

TUSCHER, V.G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, R. Significance analysis of microarray applied to the ionizing radiation response. **Proceedings of the National Academy of Science**. Washington, v.98, p.5116-5121, 2001.

TSOLAS, O.; HORECKER, B.L. Transaldolase: a model for studies of isoenzymes and half-site enzymes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v.1, p.3-13, 1973.

VATTANAVIBOON, P.; SEEANUKUN, C.; WHANGSUK, W.; UTAMAPONGCHAI, S.; MONGKOLSUK, S. Important Role for Methionine Sulfoxide Reductase in the Oxidative Stress Response of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.187, p.5831-5836, 2005.

VERHEES, C.H.; KOOT, D.G.M.; ETTEMA, T.J.G.; DIJKEMA, W.C.; VAN DER OOST, J. Biochemical adaptations of two Sugar Kinases from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. **Biochemical Journal**, London, v.362, p.245-258, 2002.

WAGNER, V.E.; BUSHNELL, D.; PASSADOR, L.; BROOKS, A.I.; IGLEWSKI, H. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing regulons: effects of growth phase and environment. **Journal of Bacteriological**, Washington, v.185, p.2080-2095, 2003.

WANG, X.; GHOSH, S.; GUO, S.W. Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, p.204-211, 2001.

KASAHARA, M.; ANRAKU, Y. Succinate- and NADH oxidase systems of *Escherichia coli* membrane vesicles. Mechanism of selective inhibition of the systems by zinc ions. **Journal of Biochemical**, Oxford, v.76, p.967-976, 1974.

KHRAPKO, K.R.; LYSOV, Y.P.; KHORLYN, A.A.; SHICK, V.V.; FLORENTIEV, V.L.; MIRZABEKOV, A.D. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. **FEBS letters**, Amsterdam, v.256, p.118-122, 1989.

UNICA – **União da Agroindústria Canavieira de São Paulo**. São Paulo, Disponível em: <https://www.unica.com.br>. Acesso em: 20 jan. 2004.

YOUNG, J.M.; TOKIKAWA, Y.; GARDAN, F. et al. Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.67-105, 1992.

YANG, Y.H.; BUCKLEY M.J.; SPEED T.P. Analysis of cDNA microarray imaged. **Briefing Bioinformatics**, Oxford, v.2, p.341-349, 2001.

YANG, Y.H.; DUDOIT S.; LUU P.; LIN D.; PENG V.; HGAI J.; SPEED, T.P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.30, p.115-121, 2002.

YOCUM, R.R.; PERKINS, J.B.; HOWITT, C.L.; PERO, J. Cloning and characterization of the *metE* gene encoding S- adenosylmethionine synthetase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, p.4604-4610, 1996.

ANEXOS

ANEXO A – Categorias funcionais dos genes de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, com números de genes que foram significativamente regulados positivamente ou negativamente no micro arranjo

(Continua)

Categoria funcional	Nº Cat.	Nº total	Regulação	
			Negativa	Positiva
I. Metabolismo intermediário	I	18	2	16
A. Degradação	I.A	4	0	4
1. Degradação de polissacarídeos e oligossacarídeos	I.A.1	1	0	1
2. Degradação de pequenas moléculas	I.A.2	3	0	3
3. Degradação de lipídeos	I.A.3	0	0	0
B. Metabolismo intermediário central	I.B	3	0	3
1. Sacaro- aminoácidos	I.B.1	0	0	0
2. Entner-Doudoroff	I.B.2	0	0	0
3. Gliconeogenesis	I.B.3	0	0	0
4. Quebra de glioxalato	I.B.4	0	0	0
5. Metabolismo de glicose	I.B.5	0	0	0
6. Rota da pentose, via não oxidativa	I.B.6	1	0	1
7. Hidrolise de nucleotídeos	I.B.7	0	0	0
8. Conversão de nucleotídeos	I.B.8	0	0	0
9. Componentes de fósforos	I.B.9	0	0	0
10. Conversão de multicompostos	I.B.10	2	0	2
11. Biossíntese de sacaro- nucleotídeos	I.B.11	0	0	0
12. Metabolismo de enxofre	I.B.12	0	0	0
C. Metabolismo de energia e carbono	I.C	4	0	4
1. Respiração aeróbia	I.C.1	1	0	1
2. Respiração anaeróbia e fermentação	I.C.2	1	0	1
3. Transporte de elétrons	I.C.3	1	0	1
4. Glicolise	I.C.4	0	0	0
5. Rota da pentose, via oxidativa	I.C.5	1	0	1
6. Metabolismo de piruvato	I.C.6	0	0	0
7. Ciclo TCA	I.C.7	0	0	0
8. Conversão pela força ATP próton motiva	I.C.8	0	0	0
D. Reguladores	I.D	7	2	5
1. Sistema de dois componentes	I.D.1	0	0	0
2. Repressores	I.D.2	3	2	1
3. Fosfatase	I.D.3	0	0	0
4. Fatores sigmas e outros componentes reguladores	I.D.4	4	0	4
E. Não caracterizado	I.E	0	0	0

ANEXO A – Categorias funcionais dos genes de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, com números de genes que foram significativamente regulados positivamente ou negativamente no micro arranjo

(Continuação)

Categoria funcional	Nº Cat.	Nº total	Regulação	
			Negativa	Positiva
II. Biossíntese de pequenas moléculas	II	11	1	9
A. Biossíntese de aminoácidos	II.A	2	0	1
1. Assimilação de nitrogênio família Glutamato	II.A.1	1	0	1
2. Família aspartato Família piruvato	II.A.2	0	0	0
3. Família glicina-serina Metabolismo de sulfato	II.A.3	1	0	0
4. Família aminoácido aromático	II.A.4	0	0	0
5. Histidinas	II.A.5	0	0	0
B. Biossíntese de nucleotídeos	II.B	1	0	1
1. Purinas	II.B.1	0	0	0
2. Pirimidinas	II.B.2	0	0	0
3. Deoxiribonucleotídeos	II.B.3	0	0	0
4. Reciclagem de nucleotídeos	II.B.4	1	0	1
C. Biossíntese de açúcar e sacaro-nucleotídeos	II.C	0	0	0
D. Biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e carregadores	II.D	7	0	7
1. Biotina	II.D.1	0	0	0
2. Ácido fólico	II.D.2	1	0	1
3. Lipoato	II.D.3	0	0	0
4. Molibdopterina	II.D.4	0	0	0
5. Pantotenato	II.D.5	1	0	1
6. Piridoxina	II.D.6	1	0	1
7. Piridina	II.D.7	0	0	0
8. Tiamina	II.D.8	0	0	0
9. Riboflavina	II.D.9	1	0	1
10. Tioredoxina, glutaredoxina, glutathione	II.D.10	0	0	0
11. Menaquinone, ubiquinone	II.D.11	2	0	2
12. Heme, porfirina	II.D.12	1	0	1
13. Proteína carregadora de carboxi-biotina	II.D.13	0	0	0
14. Cobalamina	II.D.14	0	0	0
15. Enterochelina	II.D.15	0	0	0
16. Biopterina	II.D.16	0	0	0
17. Outras	II.D.17	0	0	0
E. Biossíntese de ácido graxo e ácido fosfático	II.E	1	1	0
F. Biossíntese de poliaminas	II.F	0	0	0
G. Não caracterizado	II.G	0	0	0

ANEXO A – Categorias funcionais dos genes de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, com números de genes que foram significativamente regulados positivamente ou negativamente no micro arranjo

(Continuação)

Categoria funcional	Nº Cat.	Nº total	Regulação	
			Negativa	Positiva
III. Metabolismo de macromoléculas	III	29	4	25
A. Metabolismo de DNA	III.A	9	0	9
1. Replicação	III.A.1	1	0	1
2. Proteína estrutural de ligação de DNA	III.A.2	1	0	1
3. Recombinação	III.A.3	0	0	0
4. Reparo	III.A.4	6	0	6
5. Restrição e modificações	III.A.5	1	0	1
B. Metabolismo de RNA	III.B	12	2	10
1. RNA ribossomal	III.B.1	4	1	3
2. Proteínas ribossomais	III.B.2	5	0	5
3. Modificação e maturação dos ribossomos	III.B.3	0	0	0
4. Síntese e modificação de RNA transportador	III.B.4	3	1	2
5. Síntese e modificação de RNA, transcrição de DNA	III.B.5	0	0	0
6. Degradação de RNA	III.B.6	0	0	0
C. Metabolismo de proteínas	III.C	8	2	6
1. Tradução e modificação	III.C.1	4	1	3
2. Chaperonas	III.C.2	2	0	2
3. Degradação de proteínas	III.C.3	2	1	1
D. Metabolismo de outras macromoléculas	III.D	0	0	0
1. Polissacarídeos	III.D.1	0	0	0
2. Fosfolipídios	III.D.2	0	0	0
3. Lipoproteínas	III.D.3	0	0	0
IV. Estrutura celular	IV	7	2	5
A. Componentes de membrana	IV.A	6	1	5
B. Peptidoglicano e ácido mureico	IV.B	0	0	0
C. Polissacarídeos de superfície, liposacarídeos e antígenos	IV.C	1	1	0
D. Estrutura de superfícies	IV.D	0	0	0
V. Processos celulares	V	11	2	9
A. Transporte	V.A	10	2	8
1. Aminoácidos	V.A.1	1	0	1
2. Ânions	V.A.2	1	0	1
3. Carboidratos, ácidos orgânicos e álcoois	V.A.3	4	0	4
4. Cátions	V.A.4	1	0	1
5. Nucleotídeos, purinas e pirimidinas	V.A.5	0	0	0
6. Secreção de proteínas e peptídeos	V.A.6	2	1	1
7. Outros	V.A.7	1	1	0
B. Divisão celular	V.B	1	0	1
C. Mobilidade e quimiotaxismo	V.C	0	0	0
D. Adaptação osmótica	V.D	0	0	0
E. Apoptose	V.E	0	0	0

ANEXO A – Categorias funcionais dos genes de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, com números de genes que foram significativamente regulados positivamente ou negativamente no micro arranjo

(Conclusão)

Categoria funcional	Nº Cat.	Nº total	Regulação	
			Negativa	Positiva
VI. Elemento genético móvel	VI	6	1	5
A. Função relacionada a fago e pro-fago	VI.A	5	1	4
B. Função relacionada a plasmídio	VI.B	0	0	0
C. Função relacionada a transposon e intron	VI.C	1	0	1
VII. Patogenicidade, virulência e adaptação	VII	2	0	2
A. Avirulência	VII.A	0	0	0
B. Resposta de hipersensibilidade e patogenicidade	VII.B	0	0	0
C. Produção de toxina e detoxificação	VII.C	2	0	2
D. Degradação da parede celular do hospedeiro	VII.D	0	0	0
E. Exopolissacarídeos	VII.E	0	0	0
F. Proteínas de superfície	VII.F	0	0	0
G. Adaptação a condições atípicas	VII.G	1	1	0
H. Outros	VII.H	0	0	0
VIII. Hipotéticas	VIII	23	6	17
A. Proteínas conservadas hipotéticas	VIII.A	15	3	12
B. Proteínas hipotéticas	VIII.B	8	3	5
IX. ORFs sem categoria definida	IX	5	0	5

ANEXO B – Gene regulados negativamente e positivamente, número da ORF no genoma de *Lxx*, produto gênico, categoria funcional do gene, símbolo do gene, razão da intensidade total do gene e informação proveniente do banco de dados do *Lxx* genoma, valor de intensidade corresponde a razão da intensidade média em $\log_2$

(Continua)

Nº ORF	Produto	Cat.	Símbolo	Razão	Situação	Descrição
770	alpha-mannosidase	I.A.1		10,91	P	Metabolismo inicial de açúcar
5210	UDP-glicose 4-epimerase	I.A.2	exoB	9,07		Biosíntese de exopolissacarídeos e lipossacarídeos
10240	AgaE protein	I.A.2		8,70	P	Atua na conversão do ácido agropínico em ácido manopínico
24400	sugar kinase	I.A.2		8,50	P	Pertence a família ribokinase
5300	adenosylhomocysteinase	I.B.10	ahcY	3,30	P	Relacionado com a biosíntese de metionina
11150	S-adenosylmethionine synthetase	I.B.10	metK	3,38		Importante enzima na biosíntese de metionina.
11610	transaldolase	I.B.6	tal2	3,82		Importante na rota da pentose-fosfato
15040	cytochrome C oxidase subunit I	I.C.1	ctaD	8,87		
22610	alcohol dehydrogenase	I.C.2	adh	8,77		Oxida etanol em acetaldeído com redução concomitante do NAD;Zinco
9420	FAD-dependent oxygenase	I.C.3	encM	9,90	P	Envolvido na síntese de peptidoglicano
30	6-phosphogluconate dehydrogenase	I.C.5	gnd	10,38		Envolvido na rota da hexose monofosfato
1790	transcriptional regulator, GntR family	I.D.2	gntR	-3,69		Proteína de regulação da transcrição de DNA
1920	transcriptional regulator, LuxR family	I.D.2		7,10	P	Proteína de regulação da transcrição de DNA
7247	transcriptional regulator, TetR family	I.D.2		-8,56		
4230	transcriptional regulator	I.D.4	hipB	8,70		Regulação de proteínas de ligação ao DNA
5390	sigma-54 modulation protein	I.D.4		7,69		Fator de regulação que apresenta repressão induzida pela luz
10830	GTP pyrophosphokinase	I.D.4	relA	17,80		Relacionado a atividade celular em resposta a mudanças nutricionais
11050	pyrimidine operon regulatory protein	I.D.4	pyrR	18,13		Primeiro gene do operon responsável pela produção de pirimidina, gene regulador do operon.
11330	glutamate synthase, beta subunit	II.A.1	gltD	10,63		Relacionado com metabolismo de nitrogênio, ajuda a captação de nitrogênio na forma de amônia.
10590	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	II.A.3		3,252		Relacionado com a biosíntese de homoserina, na rota de produção de metionina.
21510	hypoxanthine phosphoribosyltransferase	II.B.4	hpt	8,19		Enzima que catalisa a reação de 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate e hypoxanthine para 5'-mononucleotídeos e pyrophosphate. Enzima importante na síntese de purina.
1440	naphthoate synthase	II.D.11	menB	9,77		Biosíntese de Menaquinona

ANEXO B – Gene regulados negativamente e positivamente, número da ORF no genoma de *Lxx*, produto gênico, categoria funcional do gene, símbolo do gene, razão da intensidade total do gene e informação proveniente do banco de dados do *Lxx* genoma, valor de intensidade corresponde a razão da intensidade média em $\log_2$

(Continuação)

Nº ORF	Produto	Cat.	Símbolo	Razão	Situação	Descrição
1830	trans-hexaprenyltranstransferase	II.D.11	hepB	9,57		Envolvido na síntese de isoprenoides, em bactérias esta relacionado com a síntese de isopentenyl tRNA, isoprenoid quinones e carregadores de açúcar e lipídeos.
11630	protoheme IX farnesyltransferase	II.D.12	cyoE	16,95		Relacionado na biosíntese de protoporfirina e protoheme, metabolismo de ferro, sendo essencial para a biosíntese de grupos heme.
21490	GTP cyclohydrolase I	II.D.2	folE	8,19		Participa na biosíntese de tetrahydrofolato
9760	pantetheine-phosphate adenyllyltransferase	II.D.5	coaD	8,36		Enzima envolvida no agrupamento de liposacarídeos, mas não apresenta atividade em substratos de liposacarídeos, envolvida diretamente na biosíntese da enzima CoA, mutantes para coaD não conseguem crescer em substratos complexos, esta enzima é utilizada como alvo para antibióticos, visto que sua inibição paralisa o crescimento bacteriano.
10710	pyridoxal kinase	II.D.6	pdxY	7,23		Participa na fosforização da vitamina B6
4350	GTP cyclohydrolase II	II.D.9	ribA	8,24		Responsável pelo primeiro passo na síntese de riboflavina.
21360	cardiolipin synthase	II.E	cls	-3,27		Responsável pela síntese do maior componente de fosfolípidios da membrana, recentemente foi descoberto alta identidade com um gene sensível a novobiocina.
16640	DNA polymerase III, epsilon subunit	III.A.1		8,59		Pertence a família de proteínas exonucleases
12825	single-strand DNA-binding protein	III.A.2		9,09		
1310	DNA repair protein	III.A.4	radC	9,17	P	Envolvido no reparo de DNA
5640	DNA repair protein RecN	III.A.4	recN	7,60		Envolvido no reparo do DNA na recombinação.
7090	DNA-3-methyladenine glycosylase I	III.A.4	tagI	9,06		Hidrolise das pontes de glicosídeos em Deoxiribose na quebra de DNA, em situações alcalinas.
9540	DNA photolyase	III.A.4	phrB	11,38		Participa no sistema de reparo de DNA causado por radiação UV, mas tem grande similaridade com citocromo fotoreceptor de luz azul.
10760	holliday junction resolvase	III.A.4	ruvC	7,71		Relacionado a correção da recombinação genética e de mutações ao sistema de reparo.
19510	DNA-binding protein	III.A.4		9,44		Envolvida no sistema de reparo de DNA em situações alcalina.
23940	DNA methyltransferase	III.A.5		3,01	P	Protege a clivagem do DNA, ajudando o sistema de restrição do tipo II
5760	tRNA-Pro-GGG	III.B.1		10,69		
5940	tRNA-Ala-CGC	III.B.1		9,28		

ANEXO B – Gene regulados negativamente e positivamente, número da ORF no genoma de *Lxx*, produto gênico, categoria funcional do gene, símbolo do gene, razão da intensidade total do gene e informação proveniente do banco de dados do *Lxx* genoma, valor de intensidade corresponde a razão da intensidade média em log₂

(Continuação)

Nº ORF	Produto	Cat.	Símbolo	Razão	Situação	Descrição
7810	tRNA-Gly-TCC	III.B.1		-4,56		
9310	tRNA-Met-CAT	III.B.1		8,92		
3160	50S ribosomal protein L7/L12	III.B.2		8,89		
18850	50S ribosomal protein L35	III.B.2		8,67		
20210	50S ribosomal protein L5	III.B.2		8,79		
20220	50S ribosomal protein L24	III.B.2		7,84		
20230	50S ribosomal protein L14	III.B.2		9,07		
10690	threonyl-tRNA synthetase	III.B.4	thrS	8,29		
11170	methionyl-tRNA formyltransferase	III.B.4	MTF	3,772		Envolvido no transporte de metionina
12370	leucyl-tRNA synthetase	III.B.4	leuS	-7,28		
25190	tRNA nucleotidyltransferase	III.B.4	pcnB	9,52		Participa na polimerase de DNA e esta envolvido no numero de copias de plasmideo, ajuda na síntese de tRNA do tipo CCA.
630	protein synthesis inhibitor	III.C.1		6,60		Envolvida na regulação de biosíntese de purina.
12940	N-acetyl-glucosamine transferase	III.C.1		8,92	P	
17290	peptidyl-tRNA hydrolase	III.C.1	pth	-3,13		Atua na substituição do aminoacyl pelo amino acido do tRNA
21650	signal peptidase I	III.C.1		9,05		
15555	heat shock protein	III.C.2		8,28		
19880	10kDa chaperonin	III.C.2	groES	10,03		
2430	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	III.C.3	vanY	-3,23	P	Induzido por vancomicina, presente em bactérias resistente a penicilina, proteína de ancoragem de membrana, responsável pela indução de mudança do tipo de peptideoglucon levando a resistência, mas não é essencial para a síntese de peptideoglucon.
18070	signal peptidase I	III.C.3	lepB	8,51		Ajuda na clivagem do sinal peptídeo
880	acetyltransferase	IV.A		8,54		
3280	integral membrane protein	IV.A		10,34	P	
5930	membrane protein	IV.A		-8,27		
16280	membrane protein	IV.A		17,27		
17510	sec-independent protein TadD	IV.A		17,11		Relatada dentro da família de metaloenzimas, e apresenta capacidade de degradação de DNA.
25200	membrane protein	IV.A		17,44		Provavelmente relacionada com transporte, do tipo transporte do Colicina B.

ANEXO B – Gene regulados negativamente e positivamente, número da ORF no genoma de *Lxx*, produto gênico, categoria funcional do gene, símbolo do gene, razão da intensidade total do gene e informação proveniente do banco de dados do *Lxx* genoma, valor de intensidade corresponde a razão da intensidade média em log₂

(Continuação)

Nº ORF	Produto	Cat.	Símbolo	Razão	Situação	Descrição
4960	UDP-glicose 4-epimerase	IV.C	galE	-3,31		Relacionada a varias reações químicas, utilizando açúcares como substrato, utiliza NAD como cofator.
6840	iron-sulfur flavoprotein	IX	isf	17,11		Possível carregador de elétrons, principalmente no processo de fermentação de acetato, sendo observada no crescimento de <i>M. thermophila</i> em acetato.
9730	secreted protein	IX		16,78		
13110	oxidoreductase	IX		9,03		
13340	permease	IX		8,35	P	
16980	LemA-like protein	IX		3,61		Participa em inúmeras reações, atuando como um inibidor para proteinase K e atua na sensibilidade a chloroquine, pepstatina e brefeldina.
15770	glycine betaine/proline porter	V.A.1	proV	16,11		Proteção em bactérias gram-negativas do solo a estresses osmóticos.
18440	ABC transporter, permease protein	V.A.2	pstA	8,39		Ligação de proteínas dependente do sistema de fosfato
320	multiple sugar porter	V.A.3		7,90		Participa no sistema de transporte de arabinose e provavelmente em outros açúcares, responsável pelo transporte de energia, Alta homologia com sistema de transporte de açúcar de <i>Agrobacterium</i> spp.
850	PTS system, IIB component	V.A.3		3,03		Atua junto ao sistema de transporte e metabolismo de açúcar
2980	ABC transporter, permease protein	V.A.3	malF	8,38		Proteína de transporte de açúcar transmembrana.
23470	sugar ABC transporter	V.A.3		7,02		
10580	ammonium transporter	V.A.4	amt	10,25		Metabolismo de nitrogênio a partir de amônia
14970	signal recognition particle receptor	V.A.6	ftsY	-3,20		Possui dois domínios ativados dependente do pH
23060	ABC transporter, permease protein	V.A.6	dppB	7,90	P	
8720	small-conductance mechanosensitive	V.A.7	mscS	-7,24		Provável proteína transmembrana, possivelmente relacionada com a osmolariedade.
14580	GTP binding protein	V.B	era	7,72		Proteínas de ligação de GDP e GTP, apresentando atividade de GTPase e é essencial para o crescimento celular.
3910	phage-related portal protein	VI.A		8,17		Proteína relacionada com transporte de proteínas relacionadas ao Fago, provavelmente uma transposase-like.
8825	integrase/recombinase	VI.A		8,17		
13040	phage-related integrase	VI.A		10,13		
23842	phage-related integrase	VI.A		6,06	P	

ANEXO B – Gene regulados negativamente e positivamente, número da ORF no genoma de *Lxx*, produto gênico, categoria funcional do gene, símbolo do gene, razão da intensidade total do gene e informação proveniente do banco de dados do *Lxx* genoma, valor de intensidade corresponde a razão da intensidade média em log₂

(Continuação)

Nº ORF	Produto	Cat.	Símbolo	Razão	Situação	Descrição
23870	phage repressor protein	VI.A		-3,44		Proteína repressora da transcrição do fago, relacionada com o controle da cópia de plasmídeos bacterianos.
3710	transposase	VI.C		3,13	P	
14447	para-aminobenzoate synthase	VII.C	pabA	3,06	P	Relacionado a biosíntese de antibiótico candidina.
16860	hemolysin III family protein	VII.C		3,34		Proteína relacionada com formação de poros na membrana plasmática, causando assim desbalanço citoplasmático e morte celular.
17310	starvation-sensing protein A	VII.G		-3,04		Relação com produção de antibiótico, como sinalizado, mas pode estar envolvido com crescimento celular e é ativado em situações de baixa condição de nutrição
2010	conserved hypothetical protein	VIII.A		8,12		
3200	conserved hypothetical protein	VIII.A		7,58		
8130	conserved hypothetical protein	VIII.A		9,92		
8360	conserved hypothetical protein	VIII.A		8,56		
9070	conserved hypothetical protein	VIII.A		8,36		
9120	conserved hypothetical protein	VIII.A		8,66		
10500	conserved hypothetical protein	VIII.A		-13,71		
11500	conserved hypothetical protein	VIII.A		8,06		
12390	conserved hypothetical protein	VIII.A		-3,13		
14510	conserved hypothetical protein	VIII.A		8,49		
14800	conserved hypothetical protein	VIII.A		6,74		
16050	conserved hypothetical protein	VIII.A		-3,03		
18000	conserved hypothetical protein	VIII.A		8,96		
19584	conserved hypothetical protein	VIII.A		8,20		
24890	conserved hypothetical protein	VIII.A		16,77		
150	hypothetical protein	VIII.B		17,51		
13860	hypothetical protein	VIII.B		-3,95		
14450	hypothetical protein	VIII.B		-3,12		
17530	hypothetical protein	VIII.B		9,03		
18270	hypothetical protein	VIII.B		15,70		
18670	hypothetical protein	VIII.B		-3,08		

ANEXO B – Gene regulados negativamente e positivamente, número da ORF no genoma de *Lxx*, produto gênico, categoria funcional do gene, símbolo do gene, razão da intensidade total do gene e informação proveniente do banco de dados do *Lxx* genoma, valor de intensidade corresponde a razão da intensidade média em $\log_2$

(Conclusão)

Nº ORF	Produto	Cat.	Símbolo	Razão	Situação	Descrição
22370	hypothetical protein	VIII.B		9,65		
23000	hypothetical protein	VIII.B		7,46		