**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE
PATOGENICIDADE PUTATIVOS EM *Xylella fastidiosa* SOB
CONDIÇÕES DE BAIXA E ALTA DENSIDADE CELULAR**

LEANDRA MARIA SCARPARI

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para a obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 2001

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE
PATOGENICIDADE PUTATIVOS EM *Xylella fastidiosa* SOB
CONDIÇÕES DE BAIXA E ALTA DENSIDADE CELULAR**

LEANDRA MARIA SCARPARI

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MARCIO RODRIGUES LAMBAIS**

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para a obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 2001

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

Scarpari, Leandra Maria
Modulação da expressão de genes de patogenicidade putativos em *Xylella fastidiosa* sob condições de baixa e alta densidade celular / Leandra Maria Scarpari. - - Piracicaba, 2001.
72 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Bactérias fitopatogênicas 2. Clorose variegada-dos-citros 3. Expressão gênica 4. Patogenicidade I. Título

CDD 589.9

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

Jamais se desespere em meio às mais sombrias aflições da vida,
pois das nuvens mais negras cai água límpida e fecunda.

Provérbio Chinês

Aos meus pais Eudir e Eliza,
exemplos de dedicação aos filhos, com quem
eu gostaria de compartilhar mais essa vitória,
OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por iluminar sempre o meu caminho.

A minha grande e amada família: minha avó Antonia, todos os meus tios e primos pelo carinho e apoio.

Em especial à família maravilhosa que Deus me deu: meus queridos pais Ediver e Eliza, e meus irmãos Paulo e Ana, pelo amor, compreensão e por sempre me apoiarem.

À FAPESP pela bolsa concedida.

À ESALQ por me proporcionar uma excelente formação acadêmica na graduação e no Mestrado.

Ao prof. Dr. Marcio Rodrigues Lambais pela orientação, amizade, incentivo e otimismo constante.

À Dra. Dirce Maria Carraro pela atenção, amizade, auxílio em várias etapas do trabalho e pelas valiosas sugestões.

Às professoras Aline Pizzirani-Kleiner e Marli Fiore pelas sugestões no Exame de Qualificação.

À Prof^ª. Dra. Helaine Carrer, à técnica Fátima, e aos amigos Irving, Tercilio, Clara, Simone e Karla (*in memoriam*), do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Plantas do Depto. Ciências Biológicas, pela amizade, solicitude e constante auxílio.

Aos funcionários do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, especialmente à Martinha, pela amizade e convívio.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo: Adriana Pedroso, Adriana Lorenzi, Ângela, Beatriz, Daniele, Denise, Iara, Juliano, Robinson, Simão, Taís e Vinícius, pela amizade, companheirismo e pelas trocas de experiências.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo Denise e Fernando pelo auxílio e amizade.

Aos amigos Eduardo de Armas, Fernando, Giuliana, Kalinca, Marco Antonio, Maria Izabel, Milena, Miriam, Simone (Bactéria) e Uemerson.

Em especial aos meus amigos queridos Elizabeth Lopes, Fabiana Santos, Fabio Marin, Inês Santos, Lucia Hoffmann e Dona Zulmira pela amizade, incentivo e apoio num momento especial da minha vida.

A todos os que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 A clorose variegada dos citros e seu agente causal - <i>Xylella fastidiosa</i>	3
2.2 Regulação das interações planta-patógeno	6
2.3 Mecanismo de percepção de quorum	7
2.4 O genoma de <i>Xylella fastidiosa</i> e suas implicações na patogenicidade	11
2.5 Metodologias para o estudo de expressão gênica diferencial.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Análises moleculares de Xf utilizada nos experimentos.....	23
3.1.1 Extração de DNA.....	23
3.1.2 Amplificação de fragmento diagnóstico de Xf	23
3.2 Determinação da curva de crescimento de <i>Xylella fastidiosa</i>	24
3.3 Análise da expressão de genes de patogenicidade putativos de Xf	25
3.3.1 Seleção de genes de interesse	25
3.3.2 Delineamento de iniciadores gene-específicos	27
3.3.3 Amplificação de fragmentos dos genes de interesse	27
3.3.4 Sub-clonagem dos amplicons de interesse.....	30
3.3.5 Confirmação da identidade dos clones selecionados	31
3.3.6 Amplificação dos fragmentos dos genes.....	32
3.4 Extração de RNA total de Xf	32
3.5 Síntese da primeira fita de cDNA	33
3.6 Análise da expressão dos genes selecionados.....	34
3.6.1 Análise da expressão dos genes selecionados por Northern blot reverso.....	34

3.6.2 Análise da expressão dos genes selecionados através de RT-PCR	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Análises moleculares de Xf utilizada nos experimentos.....	37
4.2 Determinação da curva de crescimento de <i>Xylella fastidiosa</i>	37
4.3 Amplificação de fragmentos dos genes de interesse	43
4.4 Extração de RNA total de Xf	44
4.5 Análise da expressão dos genes selecionados por “Northen blot” reverso e RT-PCR.....	47
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES DE PATOGENICIDADE PUTATIVOS EM *Xylella fastidiosa* SOB CONDIÇÕES DE BAIXA E ALTA DENSIDADE CELULAR

Autora: LEANDRA MARIA SCARPARI

Orientador: Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

RESUMO

Xylella fastidiosa (Xf) é o agente causal de doenças em várias culturas economicamente importantes. Recentemente foi identificada como sendo o agente causal da clorose variegada dos citros (CVC), doença que representa um grande problema para os citricultores paulistas, pois vem causando perdas econômicas significativas. Trata-se de uma bactéria gram-negativa, fastidiosa e restrita ao xilema das plantas hospedeiras. Um fato observado na interação Xf - citros, é que plantas infectadas por Xf podem demonstrar sintomas da doença um longo tempo após a infecção. Isto faz supor que a expressão de fatores de patogenicidade e/ou virulência ocorre somente após a população de Xf na planta atingir altas densidades celulares. Como fatores de patogenicidade/virulência de algumas bactérias são regulados por sensores de quorum, seria interessante determinar se esse mecanismo de regulação gênica ocorre em Xf, e quais genes bacterianos são regulados por densidade celular. O objetivo deste trabalho foi verificar se genes de patogenicidade putativos de Xf são modulados pela densidade celular em meio de cultura. Para tal, Xf foi cultivada em PW líquido, células no início da fase exponencial (baixa densidade celular) e na fase estacionária (alta densidade celular) foram coletadas, e RNA total foi extraído. Fragmentos de 20 genes de Xf relacionados à patogenicidade putativos foram

transferidos em arranjos ordenados para membranas de náilon, e hibridizados, sob condições de alta estríngência, com sondas complexas de primeiras fitas de cDNA marcadas com fosfatase alcalina. A detecção foi feita por quimioluminescência. Sob as condições experimentais utilizadas, os genes *fur* (XF-2344), *gumC* (XF-2369), protease-serina (XF-1851) e *rsmA* (XF-0125) tiveram sua expressão significativamente suprimida sob condições de alta densidade celular ($p < 0,05$). Já a expressão de *rpfF* (XF-1115) foi induzida significativamente ($p < 0,06$) sob condições de alta densidade celular. Os genes *gumD* (XF-2367), *gumJ* (XF-2362) e *rpfA* (XF-0290) tiveram a expressão detectada somente sob condições de alta densidade celular, enquanto a expressão de *rpfB* (XF-0287) foi detectada somente sob condições de baixa densidade celular. A expressão de celulase (XF0818), *mdoH* (XF-1623), *pluxR* (XF-0972), protease-RE (XF-1823), *rpoN* (XF-1408), *xpsK* (XF-1523) e *xpsL* (XF-1524) não foi afetada significativamente pela densidade populacional em meio PW, enquanto a expressão dos genes *luxR/UHPA* (XF-2608), poligalacturonase (XF-2466), *rpfC* (XF-1114) e *rsmB* (XF-0928) não foi detectada em ambas as condições. Usando RT-PCR, os transcritos de todos os genes, exceto *gumC*, foram detectados sob condições de baixa e alta densidade celular, indicando que a expressão de alguns genes relacionados à patogenicidade putativos em meio de cultura é muito baixa. Os resultados obtidos sugerem que os EPS são sintetizados por Xf predominantemente em condições de alta densidade celular em meio PW. Adicionalmente, os dados sugerem que Xf sintetiza uma molécula sinal similar à de Xcc em meio PW sob condições de alta densidade celular, e que a disponibilidade de ferro pode ser importante para a regulação gênica em condições de alta densidade celular. É possível que o padrão de expressão gênica observado possa ser alterado em função do meio de cultivo ou *in planta*.

EXPRESSION MODULATED PUTATIVE PATHOGENESIS-RELATED GENES IN *Xylella fastidiosa* AT LOW AND HIGH CELL-DENSITY CONDITIONS

Author: LEANDRA MARIA SCARPARI

Adviser: Prof. Dr. MARCIO RODRIGUES LAMBAIS

SUMMARY

Xylella fastidiosa (Xf) is the causal agent of several economically important plant diseases. Recently, Xf has been identified as the causal agent of citrus variegated chlorosis (CVC), a disease that represents a major economic problem for citrus growers in the São Paulo State. Xf is a gram-negative, fastidious and xylem-limited bacterium. Based on the fact that plants may show disease symptoms a long time after infection in Xf-citrus interaction, we hypothesize that the expression of pathogenicity/virulence factors in Xf occurs after the bacterial population reach high cell densities. Since pathogenicity/virulence factors of some bacteria are quorum-sensing regulated, it would be interesting to determine whether this mechanism of genetic regulation occurs in Xf, and which genes are regulated by cell-density. In order to determine whether Xf putative pathogenesis-related genes are modulated by cell-density in culture media, Xf was grown in liquid PW and cells were sampled at early log (low cell density) and stationary phase (high cell density) and total RNA was extracted. Fragments of 20 putative pathogenicity-related genes from Xf were hybridized on ordered arrays nylon membranes to alkaline phosphatase-labeled first strand cDNA from low and high cell-density conditions as probes, at high stringency conditions. Detection was performed using chemiluminescence. Our results indicate that the following putative pathogenicity-

related genes are significantly suppressed ($p < 0.05$) at high cell-density conditions: *fur* (XF-2344), *gumC* (XF-2369), serine-protease (XF-1851) and *rsmA* (XF-0125). The expression of *rpfF* (XF-1115) was significantly induced ($p < 0.06$) at high cell-density conditions. Expression of *gumD* (XF-2367), *gumJ* (XF-2362) and *rpfA* (XF-0290) was detected only at high cell-density conditions, whereas expression of *rpfB* (XF-0287) was detected only at low cell-density conditions. The expression of cellulase (XF0818), *mdoH* (XF-1623), *pluxR* (XF-0972), protease-RE (XF-1823), *rpoN* (XF-1408), *xpsK* (XF-1523) and *xpsL* (XF-1524) was not affected by the Xf population density in PW medium, whereas expression of *luxR/UHPA* (XF-2608), polygalacturonase (XF-2466), *rpfC* (XF-1114) and *rsmB* (XF-0928) was not detected under our experimental conditions. Using RT-PCR, transcripts for all genes, except *gumC*, were detected under low or high cell densities, indicating that the expression of some putative pathogenesis-related genes in culture medium is very low. Our results suggest that EPS may be synthesized by Xf mainly at high cell density conditions in PW medium. Additionally, our data suggest that Xf may synthesize a signal molecule similar to the Xcc in PW medium at high cell density conditions, and that iron availability may be important for gene regulation at high cell density conditions. It is possible that gene expression patterns observed under our experimental conditions may be altered with the culture medium used or when Xf grows *in planta*.

1 INTRODUÇÃO

A clorose variegada dos citros (CVC), ou amarelinho, foi primeiramente observada em meados de 1987 no Triângulo Mineiro e no norte e nordeste do Estado de São Paulo, tendo se alastrado com grande rapidez por toda a região citrícola brasileira. Esta doença representa um grande problema para os citricultores paulistas, causando perdas econômicas significativas. Desta maneira, os prejuízos causados pela CVC demandam uma intensificação das pesquisas sobre a interação citros - *Xylella fastidiosa*.

A bactéria freqüentemente forma agregados no interior dos vasos do xilema, constituídos de uma matriz extracelular produzida pela bactéria, a qual lembra uma massa de fibras de polissacarídeos e é denominada glicocálice. Acredita-se que esse glicocálice desempenhe papel importante na sobrevivência e patogenicidade de *Xylella fastidiosa* (Xf). Os agregados de Xf aparentemente restringem a movimentação de água e nutrientes pelo xilema, induzindo alguns dos sintomas da CVC.

Outro aspecto que parece ser importante na patogenicidade de Xf é a sua movimentação através dos vasos do xilema na colonização dos diferentes tecidos da planta. Essa movimentação parece ser dependente de enzimas que degradam a parede celular vegetal, como: pectinases, celulasas e proteases.

O genoma de Xf foi totalmente seqüenciado, facilitando muito a investigação de genes de virulência e/ou patogenicidade envolvidos no desenvolvimento da doença.

Com base no fato de que plantas infectadas por Xf podem demonstrar sintomas da doença um longo tempo após a infecção, pode-se supor que o desenvolvimento da doença depende da expressão de genes específicos, após a população de Xf na planta atingir um certo limiar.

Como fatores de patogenicidade/virulência de algumas bactérias são regulados por sensores de quorum, seria interessante determinar se esse mecanismo

de regulação gênica ocorre em Xf, e quais genes bacterianos são regulados por densidade celular.

O objetivo deste trabalho foi verificar se alguns genes de Xf relacionados à patogenicidade putativos são modulados pela densidade celular em meio de cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Clorose variegada dos citros e seu agente causal - *Xylella fastidiosa*

A clorose variegada dos citros (CVC), ou amarelinho, foi primeiramente observada em meados de 1987 no Triângulo Mineiro e no norte e nordeste do Estado de São Paulo, tendo se alastrado com grande rapidez por toda região citrícola brasileira (Rossetti & De Negri, 1990).

A CVC ocorre em todas as variedades de laranja doce sobre os diferentes porta-enxertos, exceto as tangerinas comerciais, as quais não apresentam sintomas de CVC, mesmo quando localizadas em áreas altamente infectadas (Carvalho et al., 1995).

Através de observações de campo, verificou-se que a severidade da doença é maior quando atinge plantas jovens, diminuindo gradativamente a partir dos 7 anos de plantio. Isso demonstra a existência de uma fase crítica para a instalação do pomar, a qual deve ser cuidadosamente monitorada (De Negri & Garcia Junior, 1993).

Os principais sintomas da doença são: clorose das folhas na parte mediana e superior da copa, tomando posteriormente toda a planta; folhas com sintomas de deficiências nutricionais, principalmente de Zn e K; clorose variegada nas folhas mais desenvolvidas, apresentando manchas cloróticas na superfície superior da folha e pequenas pontuações de cor marrom semelhante à exsudação de goma na superfície inferior correspondente da folha; frutos de tamanho reduzido, endurecidos e com maturação precoce, os quais são rejeitados para o comércio. Pode ainda ocorrer queda das folhas, morte dos ponteiros e diminuição ou paralisação do crescimento da planta (Donadio & Moreira, 1997; Lee et al., 1991; Rossetti & De Negri, 1990). Durante os meses de fevereiro a setembro, os sintomas foliares ficam mais evidentes devido ao estresse hídrico das plantas, provocado pela falta de chuvas (De Negri & Garcia Junior, 1993).

Os sintomas são classificados em dois níveis: nível 1 - plantas com sintomas restritos às folhas, e nível 2 - plantas com sintomas foliares e frutos miúdos. A incidência da CVC é diferenciada dentro da região nobre da citricultura, incluindo regiões produtoras do Estado de São Paulo e parte do Triângulo Mineiro. As regiões Norte e Noroeste, apresentam um total de plantas com sintomas (incluindo nível 1 e 2) de 52,6 e 43,4%, respectivamente. Já nas regiões Centro e Sul, esse total é de 28,7 e 15,7% (Fundecitrus, 2001).

O agente causal da CVC foi identificado como sendo *Xylella fastidiosa* (Xf), após a conclusão dos postulados de Koch (Lee et al., 1993). Alguns isolados de Xf causam doenças como o mal de Pierce da videira, escaldadura das folhas da ameixeira, escaldadura do pessegueiro ("phony peach"), queima das folhas da amendoeira, da ameixeira e do carvalho, nanismo da alfafa e murcha da vinca, entre outras (Lee et al., 1991; Wells et al., 1987). No Brasil, além da CVC em citros, Xf também causa doenças em cafeeiro, na região Centro-Sul. No cafeeiro infectado, ocorrem tufo de folhas nos ponteiros, sendo que essas folhas são pequenas, cloróticas, e apresentam sintomas de deficiência mineral (principalmente de Zn). Posteriormente as folhas caem e os ramos ficam completamente secos (Paradela Filho et al., 1995).

No caso da CVC, a disseminação da bactéria a curtas distâncias é feita através de cigarrinhas da família Cicadellidae (subfamília Cicadellinae) e Cercopidae, que se alimentam da seiva do xilema das plantas (Purcell & Hopkins, 1996). Atualmente foram reportadas onze espécies transmissoras, sendo que as mais comuns em citros no estado de São Paulo são *Acrogonia terminalis*, *Dilobopterus costalimai* e *Oncometopia facialis* (Fundecitrus, 2001; Roberto et al., 1996). Uma vez infectadas, as cigarrinhas adultas podem transmitir Xf eficientemente até o fim de suas vidas, o que corresponde a alguns meses. Isso ocorre porque a bactéria possui a capacidade de se multiplicar no interior do tubo digestivo do inseto, onde se aloja (Hopkins, 1989; Lopes, 1996; Purcell & Hopkins, 1996).

Outra maneira de transmissão da bactéria é através de enxertia envolvendo material contaminado (Purcell & Hopkins, 1996). A comercialização de mudas contaminadas tem sido responsável pela dispersão do patógeno a médias e longas distâncias (Carvalho, 1996).

A convivência com a CVC está sendo baseada em quatro medidas: uso de

mudas sadias, poda de ramos com sintomas iniciais em plantas com 3 anos ou mais, erradicação das plantas infectadas com até 2 anos de idade, e controle de cigarrinhas, além dos cuidados culturais do pomar, normalmente recomendados (Donadio & Moreira, 1997).

Existem 3 diferentes hipóteses sobre os mecanismos de patogenicidade de Xf: síntese de fitotoxina, desequilíbrio hormonal ou disfunção do xilema (Hayward & Mariano, 1997). Segundo Hopkins (1989), o mecanismo primário de patogênese é a falta de translocação de água e nutrientes, devido à oclusão dos vasos causada por agregados ou biofilmes bacterianos, gomas do hospedeiro e tiloses. Alguns autores acreditam que a simples oclusão dos vasos do xilema não seria suficiente para explicar todos os sintomas causados pela bactéria, defendendo a existência de outros mecanismos como a presença de fitotoxinas (Lee et al., 1982) e o desbalanço dos reguladores de crescimento (French & Stassi, 1978).

A bactéria freqüentemente forma agregados no interior dos vasos do xilema, os quais são constituídos de uma matriz extracelular produzida pela bactéria. Essa matriz constituída de polissacarídeos é denominada glicocálice. Acredita-se que o glicocálice desempenhe papel importante na sobrevivência e patogenicidade de Xf, permitindo a adesão das células umas às outras, e destas ao tecido do hospedeiro. Devido ao fato das fibras serem carregadas negativamente, o glicocálice parece funcionar como uma resina trocadora de íons, atuando como reservatório de alimentos, possibilitando a conservação e concentração de enzimas produzidas pela bactéria, e protegendo as bactérias contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Atualmente, os polissacarídeos extracelulares sintetizados por Xf são denominados goma fastidiana (Leite et al., 2001).

Outro aspecto que parece ser importante na patogenicidade de Xf é a sua capacidade de movimentação através dos vasos do xilema, e colonização dos diferentes tecidos distantes do ponto de infecção (Hopkins, 1989; Purcell & Hopkins, 1996). Essa movimentação parece ser dependente de enzimas que degradam a parede celular vegetal, como: pectinases, celulasas e proteases (Dow & Daniels, 2000; Lambais et al., 2000).

2.2 Regulação das interações planta-patógeno

As interações entre plantas e microrganismos patogênicos podem ser classificadas como incompatíveis e compatíveis (Bowler et al., 1992). As interações incompatíveis são caracterizadas pelo desenvolvimento de uma resposta de hipersensibilidade (RH), a qual é caracterizada pela morte rápida das células no local ou ao redor do ponto de infecção, e pelo não desenvolvimento da doença. Nas interações compatíveis, a RH não ocorre e o patógeno pode desenvolver-se sem restrições, induzindo o desenvolvimento da doença (Mehdy, 1994).

A resistência vegetal aos patógenos microbianos é caracterizada por sua natureza dinâmica e coordenada. Trata-se de um sistema multicomponente, onde o nível de resistência resulta da somatória das contribuições individuais de diferentes mecanismos de resistência (Pascholati & Leite, 1995). Estes mecanismos são geralmente divididos em duas categorias: pré-formados (passivos ou constitutivos) e pós-formados (ativos ou induzíveis). Os fatores pré-formados ou constitutivos englobam os mecanismos de defesa presentes nas plantas antes do contato com o patógeno. Já os pós-formados ou induzíveis estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno (Pascholati & Leite, 1995).

Em ambas as categorias, os fatores podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos, dependendo do modo primário de atuação sobre o patógeno (Agrios, 1997; Pascholati & Leite, 1995). Os fatores estruturais atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto que os bioquímicos ocorrem nas células do hospedeiro, produzindo substâncias tóxicas ao patógeno ou criando condições adversas para o crescimento do mesmo no interior da planta (Pascholati & Leite, 1995).

Entre os fatores constitutivos estruturais pode-se citar: cutícula, tricomas, estômatos, fibras ou vasos condutores, e entre os bioquímicos: fenóis, alcalóides, lactonas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos, fitotoxinas, e enzimas hidrolíticas (quitinases e β -1,3-glicanases). Dentre os fatores induzíveis estruturais estão: a formação de papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses, e dentre os bioquímicos estão: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e a explosão oxidativa (Lucas, 1998; Pascholati & Leite, 1995).

Fungos e bactérias patogênicos expressam grupos de genes envolvidos no estabelecimento da infecção, enquanto outros genes são expressos no hospedeiro como resposta. A regulação dos genes de patogenicidade envolve uma complexa troca de sinais entre o hospedeiro e o patógeno (Dixon & Lamb, 1990). O sucesso da infecção por microrganismos patogênicos requer ligação à superfície do hospedeiro, degradação das barreiras químicas e físicas do hospedeiro, produção de toxinas e inativação das defesas da planta (Lamb et al., 1989).

Os genes *avr* (“avirulence”) estão envolvidos na especificidade das interações entre raças de um determinado patógeno e cultivares ou linhagens de uma mesma espécie de planta (Camargo, 1995). Os genes *avr* podem ser essenciais para a multiplicação do patógeno no hospedeiro, como no caso de *avrBs2* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, ou para a colonização e indução de sintomas da doença, como *pthA* de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hayward & Mariano, 1997).

Normalmente, os produtos dos genes *avr* são injetados na célula hospedeira através do sistema de secreção do tipo III. O reconhecimento desses produtos gênicos pelos produtos dos genes de resistência (R) do hospedeiro ativa uma complexa cadeia de transmissão de sinais, resultando na ativação do sistema de defesa vegetal.

No genoma de *Xf*, genes homólogos aos *avr* conhecidos não foram identificados, da mesma forma que os genes codificando proteínas que compõem o sistema de secreção do tipo III (Simpson et al., 2000).

Em bactérias fitopatogênicas gram-negativas, os genes de patogenicidade/virulência, essenciais para o estabelecimento da interação planta-patógeno, podem ser ativados em função da densidade de células bacterianas no meio. Este fenômeno ocorre com *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aureofaciens*, *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens* e *Escherichia coli*, entre outras.

2.3 Mecanismo de percepção de quorum

Muitas bactérias gram-negativas podem perceber sinais moleculares produzidos por plantas e animais hospedeiros (Fuqua et al., 1996). A comunicação intercelular espécie-específica está envolvida em interações patogênicas ou simbióticas bem sucedidas de uma variedade de bactérias com plantas ou animais hospedeiros (Parsek & Greenberg, 2000). Sabe-se que as bactérias podem também

comunicar-se umas com as outras e formar comunidades que representam mais que a soma dos indivíduos que as compõem (Parsek & Greenberg, 2000).

Muitas espécies de bactérias usam sinais químicos para se comunicar e coordenar suas atividades (Parsek & Greenberg, 2000). As bactérias gram-negativas parecem usar pequenas moléculas sinais de vários tipos, sendo que o sistema de sinalização melhor estudado e presente na grande maioria dos casos, é o que usa lactonas de homoserina aciladas (LHAs) (De Kievit & Iglewski, 2000; Fuqua et al., 1994; 1996; Parsek & Greenberg, 2000).

O mecanismo de comunicação intercelular tem sido observado nos processos de esporulação e formação de corpos de frutificação de *Myxococcus xanthus*, produção de antibióticos por *Streptomyces* spp., conjugação em *Enterococcus faecalis* e luminescência em *Vibrio fischeri* (Fuqua et al., 1994; 1996).

A habilidade das bactérias em monitorar suas próprias populações em certos ambientes foi relatada primeiramente em *Vibrio fischeri* e envolve reguladores transcricionais de percepção de quorum (Fuqua et al., 1996). *V. fischeri* é uma bactéria marinha que vive simbioticamente associada a certos peixes e lulas. Ocorre em órgãos luminosos onde atinge alta densidade celular e produz luminescência (Ruby, 1996). A luminescência nestes vibrios marinhos é resultado de um processo de autoindução mediado pela difusão de moléculas de lactona de homoserina aciladas, chamadas de autoindutores (AIs) (Eberhard, 1972.; Eberhard et al., 1981). Como os AIs podem cruzar livremente a membrana plasmática, a concentração intracelular é igual à concentração no ambiente externo. Em altas densidades celulares, o AI acumula-se no meio, atingindo a concentração necessária para a ativação da transcrição do operon *lux* (*luxICDABEG*) (Fuqua et al., 1994; 1996).

A regulação dos genes *lux* é mediada por duas proteínas, LuxI e LuxR (Fuqua et al., 1996). O AI é sintetizado pelo produto do gene *luxI*, e é um co-fator de transcrição. Ele se liga ao produto do gene *luxR*, um fator de transcrição dependente de AI. Após a ligação de AI com LuxR, o fator de transcrição é ativado e se liga a seqüências regulatórias ("*lux* boxes") do promotor *lux*, ativando a transcrição dos operons *lux* (Fuqua et al., 1996).

As moléculas de LHAs são geradas pela atividade de uma única enzima que usa como substrato S-adenosilmetionina e um intermediário da via biossintética de ácidos graxos. A enzima é geralmente um membro da família LuxI de sintases de LHAs

(Ederhard et al.,1991; Fuqua et al.,1996; Moré et al., 1996). Os receptores específicos para LHAs são membros da família LuxR de reguladores transcricionais (Fuqua et al., 1994;1996; Parsek & Greenberg, 2000). Os membros da família LuxR possuem dois domínios, um C-terminal de ligação ao DNA, e um N-terminal para a ligação da LHA. Frequentemente os genes codificando a sintase de LHA e o fator de transcrição são ligados, sendo que a orientação de um gene em relação ao outro é variável (Parsek & Greenberg, 2000).

Muitas bactérias gram-negativas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Escherichia coli* e *Rhizobium leguminosarum*, possuem mecanismos de percepção de quorum homólogos ao sistema LuxR/LuxI, os quais estão envolvidos na regulação de genes de virulência e/ou patogenicidade, transferência conjugativa de plasmídios e síntese de antibióticos (Cubo et al.,1992; Fuqua et al.,1994,1996; Pierson III et al.,1996).

A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* é um fitopatógeno que induz o desenvolvimento de galhas em um grande número de espécies de plantas. Na presença de um componente fenólico específico (acetoseringona), produzido por células vegetais injuriadas, genes *vir* plasmidiais são ativados e direcionam a mobilização e transferência de um fragmento de DNA (T-DNA), contendo genes envolvidos na síntese de fitormônios (indução de tumor) e opinas, para o núcleo da célula da planta (Lambais, 1995). A transferência conjugativa do plasmídio é regulada pelas proteínas TraR e TraI, as quais possuem homologia com LuxR e LuxI, respectivamente (Fuqua & Winans, 1994; Fuqua et al., 1995). *A. tumefaciens* também produz uma LHA, com a função de AI. Os AIs de *A. tumefaciens* e *V. fischeri* diferem apenas no número de carbonos na cadeia acil (Fuqua et al., 1996). Como em *V. fischeri*, TraR é um fator de transcrição que regula a expressão dos genes *tra*, e TraI é a sintase de AI.

Erwinia carotovora é um fitopatógeno que coloniza o tecido vascular e causa a podridão mole em plantas suscetíveis. Seus fatores de virulência foram identificados como enzimas degradadoras da parede celular vegetal (pectato liase, poligalacturonase, celulase e protease). A síntese e secreção dessas enzimas são estimuladas em alta densidade celular, e dependentes de uma lactona de homoserina acilada, a qual também é necessária para patogenicidade (Barras et al.,1994; De Kievit & Iglewski, 2000; Jones et al.,1993). A bactéria usa o sistema de percepção de quorum

para assegurar que a produção de exoenzimas não ocorra até que um número suficiente de bactérias seja atingido, assegurando que a destruição dos tecidos e evasão das defesas da planta sejam bem sucedidas (Jones et al., 1993; Pirhonen et al., 1993).

Em *Pseudomonas aeruginosa*, o sistema de percepção de quorum é requerido para a maturação de biofilmes e para virulência (Parsek & Greenberg, 2000). Trata-se de um patógeno oportunista animal e vegetal bem sucedido, que produz um conjunto de fatores de virulência extracelulares, incluindo exoproteases, sideróforos, exotoxinas e lipases. A expressão desses fatores também é regulada por percepção de quorum. Estudos genéticos revelaram dois sistemas de percepção de quorum em *P. aeruginosa*: LasR-LasI e RhlR-RhlI, sendo que este último é requerido para a síntese de vários metabólitos secundários, bem como do fator sigma S, na fase estacionária de crescimento (De Kievit & Iglewski, 2000; Parsek & Greenberg, 2000).

Outros exemplos da importância da percepção de quorum na regulação de genes bacterianos tem sido publicados. Em *Rhizobium leguminosarum*, uma proteína sintetizada na rizosfera (RhiA), mas não em nódulos, é também induzida em condições de alta densidade celular (Cubo et al., 1992). A expressão de *rhiA* requer o gene *rhiR*, homólogo aos membros da família *luxR*. Embora uma proteína homóloga a LuxI não tenha sido identificada em *R. leguminosarum* até o momento, foi demonstrado que a bacteriocina “small” produzida por esta bactéria é uma LHA, a qual pode estar envolvida na sinalização de estresses externos (Schripsema et al., 1996). A biossíntese do antibiótico fenazina por *Pseudomonas aureofaciens* na rizosfera de trigo também envolve uma LHA, sintetizada por PhzI, e o regulador de transcrição PhzR, homólogos a LuxI e LuxR, respectivamente (Pierson III et al., 1996; Pierson et al., 1998).

A lista de bactérias que utilizam sistemas de percepção de quorum continua a crescer, incluindo patógenos animais e vegetais (De Kievit & Iglewski, 2000). Cha et al. (1998) testaram 106 isolados de bactérias, representando 7 gêneros que se associam com plantas, para a produção de compostos com atividade de LHA. A maioria dos isolados de *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Pantoea*, e metade dos isolados de *Erwinia* e *Pseudomonas*, apresentaram resultados positivos. No caso de *Xanthomonas*, apenas alguns isolados produziram sinal detectável.

Na interação Xf-citros, um fato observado constantemente é que plantas

infectadas pela bactéria podem apresentar sintomas da doença um longo tempo após a infecção. Isto sugere que a síntese de fatores de patogenicidade/virulência em Xf é induzida após a população da bactéria no xilema atingir um certo limiar. Essas observações sugerem a existência de um mecanismo de percepção de quorum em Xf, importante para o desenvolvimento da CVC.

Em Xf, foram identificados dois genes homólogos aos pertencentes à família LuxR de reguladores transcricionais, embora não tenham sido encontrados genes homólogos a *luxI* (Lambais et al., 2000). Porém, isso não significa, que a bactéria não possua um mecanismo de percepção de quorum, já que os membros da família *luxR/luxI* apresentam baixa homologia de nucleotídeos entre si. Além disso, Xf pode possuir Als diferentes das LHAs conhecidas e receptores não homólogos a LuxR. Alternativamente, Xf pode reconhecer LHAs sintetizadas por outras bactérias endofíticas.

2.4 O genoma de *Xylella fastidiosa* e suas implicações na patogenicidade

Xylella fastidiosa (Xf) é uma bactéria do tipo bastonete, gram-negativa, não móvel, aflagelada, fastidiosa, limitada ao xilema, e evolutivamente relacionada a *Xanthomonas* spp. Sua caracterização bioquímica mostrou que Xf é aeróbia estrita, com crescimento ótimo em pH entre 6,5 e 6,9 e temperatura entre 26 e 28°C (Wells et al., 1987). Sob microscópio eletrônico, suas células apresentam sulcos ou invaginações, possuindo aspecto ondulado. A parede celular é multilaminar, enrugada, com acentuadas reentrâncias (Chang & Walker, 1988, Davis et al., 1981; Leite Junior, 1996; Mizubuti et al., 1994; Wells et al., 1987). Fry & Milholland (1990), sugerem que a parede celular ondulada de Xf pode ser um fator envolvido no reconhecimento patógeno-hospedeiro. *In vitro*, as células dessa bactéria apresentam crescimento lento e são altamente exigentes em nutrientes. Todos os isolados de Xf exigem meios semi-definidos complexos e especializados para o seu crescimento (Hopkins, 1989).

Xylella fastidiosa, estipe 9a5c, foi o primeiro fitopatógeno a ter seu genoma completamente seqüenciado. O genoma de Xf é composto por um cromossomo circular com 2.679.305pb, e dois plasmídios de 51.158 e 1.285pb, denominados pXF51 e pXF1.3, respectivamente, e apresenta teores de G+C de 52,7% (Simpson et al., 2000).

A análise do genoma de Xf revelou um grande número de genes cujos produtos possuem alta similaridade na sequência de aminoácidos com produtos de genes de *Xanthomonas* spp., particularmente *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (Simpson et al., 2000). O tamanho relativo dos genomas de Xf (~2,7Mb) e Xcc (~5,5Mb) sugere que Xf pode representar um fitopatógeno “mínimo”. Dessa forma, as diferenças podem representar as distintas estratégias de patogenicidade e capacidade de crescimento de ambos os organismos: Xf depende das cigarrinhas para sua transmissão e é limitada ao xilema das plantas, enquanto Xcc pode infectar plantas intactas e é capaz de crescer e sobreviver na superfície de folhas de plantas e também no solo (Dow & Daniels, 2000).

A principal diferença entre Xf e *Xanthomonas* spp é a ausência do sistema de secreção do tipo III, o qual é amplamente distribuído entre bactérias fitopatogênicas (Simpson et al., 2000). A função deste sistema de secreção é injetar determinantes de patogenicidade e/ou virulência, incluindo produtos dos genes *avr*, diretamente nas células de seus hospedeiros (Dow & Daniels, 2000; He, 1998; Romantschuk et al, 2001).

Em várias bactérias patogênicas, genes homólogos aos genes envolvidos na síntese de flagelos, codificam proteínas envolvidas no sistema de secreção do tipo III. A montagem e o funcionamento do sistema de secreção do tipo III envolvem os genes *hrp*.

Os genes *hrp* têm pelo menos 3 funções bioquímicas: regulação gênica, secreção de proteínas e produção de proteínas elicitoras de RH. São induzidos em ambientes pobres em nutrientes, como por exemplo o apoplasto de plantas, sugerindo envolvimento com a nutrição da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* dentro da planta hospedeira. Em *Pseudomonas syringae*, os genes *hrpR* e *hrpS* são os primeiros a ser expressos, sendo que os produtos desses dois genes ligam-se e ativam o promotor do gene *hrpL*. O produto do gene *hrpL*, por sua vez, ativa os demais genes *hrp*, *avr*, e outros genes relacionados à patogenicidade (Gopalan & He, 1996).

Em Xf não foram identificados genes *hrp* nem genes semelhantes a *avr* (Simpson et al., 2000), sugerindo que mesmo que a bactéria possua genes *avr*, seus produtos não são liberados via sistema de secreção do tipo III (Lambais et al, 2000). Porém, apesar de não possuir o sistema de secreção do tipo III, Xf apresenta todas as

vias metabólicas conhecidas para a secreção de fatores de virulência extracelulares presentes em bactérias gram-negativas (Keen et al., 2000).

Enzimas capazes de degradar a parede celular vegetal são secretadas pelo sistema de secreção do tipo II. Esse sistema é requerido para virulência em *Xcc* e *X. oryzae* pv. *oryzae* (Dow et al., 1987). Em *Xcc* foi identificado um agrupamento de genes com funções na secreção de proteínas e patogenicidade (Dums et al., 1991). Esse agrupamento de genes regula a secreção de várias enzimas extracelulares, incluindo endoglucanase, pectinases e proteases (Dow et al., 1987; 1989), e foi denominado *xps* “Xanthomonas protein secretion” (Dums et al., 1991).

Trata-se de um sistema de secreção dependente de sinal, composto de um agrupamento de 11 genes: *xpsEFGHIJKLMND* (Dums et al., 1991). A mesma organização celular encontrada em *Xcc* ocorre em *Xf*, e a maioria dos produtos dos genes possui alta similaridade na seqüência de aminoácidos (Dow & Daniels, 2000).

Embora esteja claro que existem múltiplas vias e mecanismos de secreção de proteínas em bactérias gram-negativas, muitas bactérias apresentam um mecanismo comum de secreção via periplasma (Pugsley et al., 1990). Esse mecanismo envolve um processo com dois passos: primeiro as proteínas são transferidas através da membrana citoplasmática, via um mecanismo dependente de uma seqüência sinal. O segundo passo é a transferência através da membrana externa, um processo que envolve funções que podem ser específicas para proteínas individuais ou grupos de proteínas (Dums et al., 1991). O agrupamento *xps* é requerido para o segundo passo da secreção do tipo II em *Xcc*. A deleção desse agrupamento leva ao acúmulo de proteínas secretadas no periplasma (Lee et al., 2001).

A maioria dos patógenos de plantas são capazes de produzir uma variedade de enzimas degradadoras da parede celular vegetal, tais como celulasas, xilanasas, pectinases e proteases, as quais podem ser fatores de patogenicidade importantes (Norman-Setterblad et al., 2000).

Em *Xf*, foram identificados dois genes codificando celulase, e um que codifica uma poligalacturonase (precursora de pectinase), os quais exibem alta similaridade com genes de *Ralstonia solanacearum*, agente causal da murcha do tomateiro (Simpson et al., 2000).

Xcc produz pelo menos três proteases que podem ser importantes nas infecções naturais, pelo menos nos estádios iniciais do desenvolvimento da doença

(Hayward & Mariano, 1997). A análise do genoma de Xf revelou a presença de muitas proteases, mas nenhuma delas pode ser associada à patogenicidade/virulência.

Fry et al. (1994) isolaram duas proteases de um isolado de *Xylella fastidiosa* de uva, as quais foram designadas P1 e P2, apresentando peso molecular de 50 e 54kDa, respectivamente. A produção de proteases correlacionou-se positivamente com o crescimento bacteriano em meio de cultura, e atingiu um nível máximo no início da fase estacionária do crescimento da bactéria. As proteases desse isolado de Xf apresentaram atividades máximas ótimas à temperatura de 50°C e pH 9,0. Os autores dizem que o papel dessas proteases pode variar dependendo do sistema hospedeiro-patógeno, e no caso do sistema Xf-videira, este não é conhecido.

Outros fatores extracelulares podem também estar envolvidos na regulação da interação de Xf com seus hospedeiros. Estruturas semelhantes a fímbrias são facilmente observadas em Xf colonizando plantas hospedeiras e insetos vetores, mas são raramente vistas em cultura pura (Simpson et al., 2000). Nesses dois primeiros ambientes, o fluxo de seiva possui grande velocidade. Dessa forma, é possível que fímbrias do tipo IV sejam necessárias para ligação polar de Xf à parede do intestino do inseto, contribuindo para a colonização do vetor e sobrevivência das células bacterianas. Estas fímbrias devem ser importantes ainda para aderência de Xf à parede celular do xilema, bem como para formação de microcolônias nos vasos do xilema e/ou movimentação da bactéria no sistema vascular da planta (Lambais et al., 2000).

Xf produz também um exopolissacarídeo (EPS) semelhante à goma xantana produzida por Xcc, a qual consiste de moléculas de glicose com ligações β -1,4, sendo cada molécula alternada de glicose substituída por um trissacarídeo com duas manoses e um ácido glucurônico (Hayward & Mariano, 1997). A goma xantana em Xcc é sintetizada e secretada pelos produtos dos genes *gum*. Esse operon possui 16kb e apresenta 12 ORFs (*gumB* a *gumM*) (Katzen et al., 1998). Tem sido sugerido que a xantana seria mais importante para a virulência do que para a patogenicidade de Xcc (Hayward & Mariano, 1997). Embora tenha sido mostrada uma correlação entre mutação em algum gene *gum* e redução da virulência, não está muito claro se qualquer passo específico da montagem, decoração ou polimerização das unidades de pentassacarídeos seria requerido para a infecção da planta (Katzen et al., 1998).

Embora a goma xantana não seja essencial para a virulência à planta, mudanças específicas no último estágio da biossíntese de xantana levam a uma redução da virulência de Xcc (Katzen et al., 1998).

Katzen et al. (1998) mostraram que a atividade catalítica está localizada no domínio C-terminal do produto do gene *gumD*, e que o mesmo gene provavelmente é responsável pelo primeiro passo da biossíntese de xantana. O único gene *gum* caracterizado geneticamente e bioquimicamente é *gumL*, o qual codifica uma cetopiruvato transferase. Os genes *gumD*, *H*, *I*, *K* e *M* são requeridos para a polimerização das subunidades ligadas a lipídios (Dow & Daniels, 2000; Katzen et al, 1998). Os produtos dos genes *gumB*, *C*, *E* e *J* parecem ser necessários para a polimerização e translocação do polímero (Dow & Daniels, 2000). *GumB* parece estar envolvido na translocação do polissacarídeo, *gumC* influencia no grau de polimerização, e o produto de *gumE* parece estar diretamente relacionado à polimerização de xantana. Mutação em *gumB* ou *gumC* é letal no tipo selvagem devido aos efeitos tóxicos do acúmulo de lipídios intermediários da biossíntese de xantana (Katzen et al, 1998).

Xf possui genes com alta similaridade a nove dos doze genes *gum* presentes em Xcc (*gumBCDEFHJKM*). Genes homólogos a *gumG*, *gumI* e *gumL* não estão presentes em Xf, sugerindo que os EPS produzidos por Xf (goma fastidiana) sejam menos viscosos que os produzidos por Xcc (goma xantana) (Simpson et al., 2000). Silva et al. (2001) propõem que estes EPS produzidos por Xf consistem de unidades repetidas de tetrassacarídeos polimerizados montados através de adição sequencial de glicose-1-fosfato, glicose, manose e ácido glucurônico.

Os níveis de expressão dos genes *gum* em Xcc dentro da planta diferem de acordo com o tecido inoculado. As diferenças dos níveis de expressão pela bactéria inoculada no mesófilo e no xilema podem, em parte, refletir diferenças na disponibilidade de nutrientes nesses dois ambientes (Vojnov et al., 2001). Resultados obtidos pelos mesmos autores, sugerem fortemente que Xcc produz copiosas quantidades de xantana apenas nas fases finais da doença. A produção limitada de EPS nas fases iniciais da doença, permitiria aderência das colônias de bactérias à superfície das células vegetais, promovendo o estabelecimento de biofilmes ou microcolônias, o funcionamento do sistema de secreção do tipo III, e ainda permitiria movimentação da bactéria. Por outro lado, a produção de EPS nos estágios finais da

patogênese, pode proteger a bactéria contra vários estresses como dessecação e danos causados por espécies ativas de oxigênio (Kiraly et al., 1997).

Outra classe de sacarídeos extracelulares são os oligossacarídeos derivados de membrana (ODM). Estas glucanas periplasmáticas estão relacionadas à patogenicidade em *Pseudomonas syringae*. Os ODMs de *E. coli* são membros representativos dessa família de glucanas periplasmáticas das bactérias gram-negativas (Loubens et al., 1993). Nesta bactéria, o operon *mdoGH*, cuja expressão é controlada pelo potencial osmótico do meio, codifica 2 proteínas (MdoG e MdoH), as quais são provavelmente as únicas proteínas especificamente envolvidas na biossíntese do esqueleto de glucanas (Debarbieux et al., 1997; Loubens et al., 1993). Foi mostrado que a proteína MdoH, produto do segundo gene do operon, estende-se sobre toda a membrana citoplasmática. MdoH possui 97 kDa, 847 aminoácidos e é expressa em níveis baixos. Um total de 24% dos aminoácidos de MdoH são hidrofóbicos e a localização desta proteína na membrana parece ser uma limitação para a sua síntese. O acúmulo de uma grande quantidade desta proteína na membrana poderia tornar-se tóxica para as células (Debarbieux et al., 1997).

A sequência de nucleotídeos do operon *mdoGH* de *E. coli* revelou uma forte similaridade (69% de 3.264 nucleotídeos são idênticos) com 2 genes presentes no locus *hrpM* de *P. syringae* pv. *syringae* (Loubens et al., 1993). Em Xf foram encontrados genes homólogos aos genes *mdoG* e *mdoH* de *E. coli* (Simpson et al., 2000).

Em Xcc, a síntese de enzimas extracelulares, incluindo protease, poligalacturonato-liase, endoglucanase e amilase e também EPS, coletivamente essenciais para a patogenicidade da bactéria, é regulada por um agrupamento de genes designado *rpf* ("regulation of pathogenicity factors"). Esse agrupamento é composto por 8 genes *rpfA-H* (Barber et al., 1997; Tang et al., 1991). Dow et al. (2000) identificaram um gene adicional desse agrupamento, denominado *rpfI*. Os experimentos com mutagênese, através de transposons, sugeriram que pelo menos cinco regiões distintas (A a E) são requeridas para a produção de enzimas extracelulares e EPS, e para a patogenicidade (Tang et al., 1991).

Não está claro porque tantos genes estão envolvidos na regulação coordenada positiva da síntese de enzimas e EPS em Xcc. Uma possibilidade é que os genes separados operam em paralelo, cada um respondendo a um fator ambiental ou

metabólico diferente. Outra possibilidade é que cada componente regulatório module ou a síntese ou a atividade do próximo membro do conjunto (Tang et al., 1991). Embora esses genes ligados pareçam regular os mesmos produtos finais, não há evidência até agora de que atuem independentemente ou formem parte de uma via metabólica regulatória ou em cascata (Barber et al., 1997).

O gene *rpfA* codifica a principal aconitase de *Xcc*, a qual atua na homeostase de ferro e também age como reguladora da expressão gênica de EPS e de duas enzimas extracelulares (uma protease-serina e uma endoglucanase), sendo esta regulação possivelmente relacionada a mudanças nos níveis intracelulares de Fe (Wilson et al., 1998). Os genes *rpfB* e *rpfF* estão envolvidos na síntese de uma molécula sinal difusível de baixo peso molecular (DSF), a qual pode estar envolvida na comunicação entre as bactérias durante a percepção de quorum (Barber et al., 1997). A percepção dessa molécula pode envolver um sistema de transdução de sinais compostos por RpfG, RpfH e RpfC (Dow et al., 2000). Estes genes codificam elementos que podem juntar-se a DSF para a regulação da expressão de genes de patogenicidade (Slater et al., 2000). No sistema *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* - arroz, o gene *rpfC* está envolvido na patogenicidade, contribuindo mais para a manifestação de sintomas do que para o crescimento ou sobrevivência da bactéria dentro da planta (Tang et al., 1996). A sequência de nucleotídeos do gene *rpfC* de *Xcc* sugere que esse gene codifica uma proteína regulatória de um sistema de dois componentes (Tang et al., 1991). A proteína RpfC em *X. oryzae* pv. *oryzae* apresenta extensiva homologia a domínios conservados de ambas as proteínas sensora e regulatória dos sistemas citados acima (Tang et al., 1996).

Embora o sistema regulatório mediado por DSF possua algumas características comuns com aquele mediado por derivados de LHAs, este parece ser um novo sistema, uma vez que os produtos dos genes *rpfF* e *rpfB* não possuem relação com as várias proteínas das famílias LuxI e LuxR ou outras proteínas envolvidas nesses sistemas. Além disso, DSF não se comporta como autoindutor, e acumula-se no início da fase estacionária, com os níveis declinando subsequente. Essas características não haviam sido reportadas para outros reguladores extracelulares de baixo peso molecular, como as LHAs (Barber et al., 1997). Uma visão alternativa da atuação de DSF na patogenicidade de *Xcc* é que esta

pode atuar como um sinal induzido em situações de estresse ou privação de nutrientes para a síntese de enzimas extracelulares e EPS (Barber et al., 1997).

Existe uma região no genoma de Xf com alta homologia à região cromossômica de Xcc que contem o agrupamento de genes *rpf*. Além disso, existe alta similaridade entre a sequência de aminoácidos de todos os genes presentes em ambos os cromossomos (Dow & Daniels, 2000). Isto sugere que ambas as bactérias podem regular a síntese de fatores de patogenicidade, como EPS, através de mecanismos similares (Simpson et al., 2000).

Mecanismos alternativos ou complementares, envolvendo produtos dos genes *rpf* e outros genes, podem estar envolvidos na regulação das interações planta-patógeno.

A homeostase de ferro é um processo importante na regulação da expressão de genes envolvidos na patogenicidade de bactérias (Vasil & Ochsner, 1999). A expressão de um grande número de genes (mais de 40 em alguns casos) é diretamente controlada pela concentração intracelular de ferro, na forma Fe (II), via a proteína Fur ou homólogo na maioria das bactérias gram-negativas. A proteína Fur de *Escherichia coli* é relativamente pequena, apresentando 17kDa e 148 aminoácidos. É sintetizada a partir do gene *fur* ("ferric uptake regulation") e participa da regulação da absorção de ferro (Hantke, 1981; 1982). Quando o ferro está disponível dentro da bactéria, a proteína forma um complexo com Fe (II), o qual liga-se a várias sequências operadoras específicas ("fur boxes"), bloqueando a transcrição de genes funcionais. O gene *fur* possui seu próprio "fur box", sendo assim também regulado pelo complexo fur-Fe(II) (Ratlegde & Dover, 2000). Em Xcc, existem evidências de que RpfA (aconitase) também esteja envolvida na homeostase de Fe (Wilson et al., 1998).

No caso de Xf, a identificação de receptores para vários sideróforos e genes envolvidos no seu transporte através da membrana, sugere que o ferro pode ser importante para a sobrevivência da bactéria no xilema (Lambais et al., 2000). Xf possui também genes envolvidos na homeostase de Fe, como o gene *fur* e *rpfA*.

Em bactérias gram-negativas, a ativação da transcrição em resposta a estímulos externos frequentemente envolve o fator alternativo σ^{54} , o qual é codificado pelo gene *rpoN* (Hendrickson et al., 2000). Esse fator é essencial para a ativação da RNA polimerase e transcrição de genes específicos em condições de estresse (e.g. falta de nitrogênio no meio) (Fellay et al., 1991). Xf possui um gene com homologia de

64% com o gene *rpoN* de *Xanthomonas campestris*, sugerindo que a transcrição de alguns genes importantes pode ser regulada por esse fator sigma alternativo

No caso de algumas espécies bacterianas fitopatogênicas, *rpoN* tem sido implicado indiretamente como um regulador de genes *hrp*. No sistema *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* - *Nicotiana tabacum*, *rpoN* é requerido para patogenicidade e RH, agindo ao nível de transcrição de *hrpL*. Porém, não é requerido para a elicitação dos sintomas de doença (Hendrickson et al., 2000).

Em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, a regulação dos genes *hrp* independe de *rpoN*, mostrando-se fundamentalmente diferente do que ocorre em *Pseudomonas* e outras *Xanthomonas* (Horns & Bonas, 1996).

Lilley & Bassler (2000) mostraram que o fator alternativo σ^{54} e a proteína LuxO regulam genes por percepção de quorum em *Vibrio harveyi*. Esta bactéria produz dois autoindutores diferentes: AI-1 (sintetizado por *luxN*), usado na comunicação intra-espécie, e AI-2 (sintetizado por *luxPQ*), o qual parece não ser uma LHA, e é usado para sinalização entre células de espécies diferentes. Além da luminescência, regulam também a produção de sideróforos e morfologia das colônias (rugosidade).

As proteínas RsmA e RsmC, e o RNA regulatório *rsmB*, são os principais componentes de um sistema regulatório global que controla a expressão de gênica pós-transcricionalmente em várias bactérias fitopatogênicas e enterobactérias (Cui et al., 1999). *Escherichia coli* apresenta um sistema muito similar: *csr* ("carbon storage regulator"), envolvido na regulação do armazenamento de carbono. Este sistema compreende *CrsA* e *crsB*, homólogos a RsmA e *rsmB* respectivamente, controlando o acúmulo de glicogênio, as propriedades da superfície celular, aderência, mobilidade, e o tamanho da célula (Cui et al., 1995; Romeo, 1998).

Os genes *rsmA* e *rsmB*, estão envolvidos na regulação de metabólitos secundários em várias espécies de *Erwinia*, controlando a produção de enzimas extracelulares (pectato-liase, poligalacturonase, celulase e protease), antibióticos, pigmentos e polissacarídeos, (Barras et al., 1994). A produção destas substâncias é estimulada durante o final da fase exponencial e o início da fase estacionária de crescimento, quando a bactéria atinge alta densidade celular e ocorre limitação de nutrientes e outras formas de estresse (Pierson III et al., 1998). Além disso, os níveis das moléculas de lactona de homoserina (envolvidas no mecanismo de percepção de

quorum) e harpina (molécula elicitora de RH), também são regulados por esses genes (Liu et al., 1998; Mukherjee et al., 1996).

RsmA é uma proteína que se liga ao RNA, desestabilizando-o e promovendo seu declínio. Atua, assim, como regulador global negativo (Cui et al., 1995; Ma et al., 2001). *rsmB* é um RNA regulatório único que neutraliza a ação de RsmA, através da formação de uma ribonucleoproteína complexa (Liu et al., 1998; Romeo, 1998). Existem evidências crescentes de que em *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, os níveis e a atividade de RsmA são rigorosamente controlados pela bactéria para prevenir o declínio de transcritos de genes com funções essenciais (Cui et al., 1999).

Um novo gene regulatório, *rsmC*, foi clonado e caracterizado. Este gene ativa a produção de RsmA e reprime a produção de enzimas extracelulares e harpina, a transcrição de *rsmB*, e a virulência em *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Cui et al., 1999).

Em Xf observa-se a presença de homólogos de *rsmA* e seu RNA cognato, *rsmB*, sugerindo que Xf pode também regular expressão de genes pós transcricionalmente (Keen et al., 2000; Simpson et al., 2000).

Alguns genes de Xf têm similaridade com profagos, sugerindo a ocorrência recente de transferência lateral de genes (Keen et al., 2000). Aproximadamente 7% do genoma de Xf corresponde a seqüências homólogas a DNA de bacteriófagos de fita dupla (Simpson et al., 2000). A presença de vários genes associados a seqüências de bacteriófagos, encontrados anteriormente apenas em patógenos animais, indicam a aquisição de funções adicionais que podem facilitar a ligação e crescimento de Xf no interior dos insetos vetores (Keen et al., 2000). Também foram identificados genes que podem ter a função da síntese de policetídeos. Como toxinas de policetídeos são freqüentemente fatores de virulência em bactérias patogênicas, esses genes podem indicar a ocorrência de toxinas similares em Xf (Keen et al., 2000).

2.5 Metodologias para o estudo de expressão gênica diferencial

A expressão gênica de uma célula reflete todos os processos metabólicos que ocorrem na mesma. Portanto, o estudo de genes com expressão diferencial é de grande importância, pois permite identificar quais genes são ativados ou desativados em determinada condição e, conseqüentemente, quais os reflexos no metabolismo da

célula. Segundo Wang et al. (2001), a clonagem e identificação de genes ou proteínas diferencialmente expressos é útil não somente para identificar suas funções, mas também para descobrir os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de algumas doenças.

Os métodos tradicionais para a identificação de genes com expressão diferencial são a hibridização diferencial e a hibridização subtrativa. A hibridização diferencial ou “screening” diferencial envolve a construção de dois bancos de cDNA, ou seja, do tecido infectado e do tecido não infectado. Extrai-se RNA total ou RNAm e, a partir deste, sintetizam-se sondas de cDNA. Estas sondas são hibridizadas com réplicas dos dois bancos. Os clones que hibridizam com as sondas de ambos os bancos não são diferenciais, enquanto aqueles que hibridizam com sondas de apenas um banco, representam genes diferencialmente expressos. Trata-se de um método trabalhoso e que permite a identificação de genes expressos em abundância (Sambrook et al., 1989). Na hibridização subtrativa, a partir do RNA total ou RNAm, sintetizam-se sondas de cDNA do tecido infectado, ou seja, onde o gene está sendo expresso. Estas sondas são então hibridizadas com RNA total ou RNAm do tecido não infectado. Os genes expressos nas duas situações formam híbridos RNA:DNA e são separados das fitas simples de cDNA, através de cromatografia em colunas de hidroxiapatita. As fitas simples de cDNA representam os genes com expressão diferencial, e servem de molde para a síntese de sondas subtrativas que são utilizadas na seleção de clones em uma biblioteca de cDNA. Apesar de ser um método muito trabalhoso, permite a identificação de genes expressos em menor abundância (Sambrook et al., 1989). Ambos os métodos descritos requerem grandes quantidades de RNA (nem sempre disponíveis) e demandam um tempo prolongado.

Dessa forma, algumas técnicas foram desenvolvidas através de modificações na hibridização subtrativa, incluindo um passo de subtração, como por exemplo RDA (Análise Diferencial Representativa) e SSH (Hibridização Subtrativa Supressiva). Outros métodos desenvolvidos, como o DD (“Display Differential”) e SAGE (Análise em Série da Expressão Gênica), não incluem a etapa de subtração (Martin & Pardee, 2000; Wang et al., 2001).

Recentemente foram desenvolvidos os “Microarrays de DNA”, os quais permitem avaliar simultaneamente o nível de expressão de milhares de genes em um único ensaio de hibridização. Cada arranjo consiste de um padrão reproduzível de

milhares de seqüências DNA (produtos de PCR ou oligonucleotídeos) ligados a um suporte sólido, geralmente vidro. Sintetiza-se sonda fluorescente complexa de RNA ou DNA a partir de RNAm e esta é hibridizada com um DNA complementar no arranjo. Após as lavagens do excesso de sonda, os sinais de hibridização são detectados em fluorímetro apropriado (Harrington et al., 2000).

O genoma relativamente pequeno dos procariotos e eucariotos simples como as leveduras, permite que todos os seus ORFs, e também regiões intergênicas, possam ser representadas em um único ensaio (Harrington et al., 2000).

As estratégias de marcação utilizadas para eucariotos são baseadas na presença do poliA nos RNAm. Já para os procariotos, estes métodos não se aplicam, devido à ausência do poliA nos RNAm (Harrington et al., 2000). De Saizieu et al. (1998), na primeira publicação reportando a análise de expressão gênica em bactérias através de “microarrays”, mostraram que a presença de rRNA não prejudica a detecção de genes transcritos em baixos níveis.

Outra alternativa para as análises de expressão gênica diferencial consiste na análise dos produtos proteicos, através dos métodos de eletroforese bidimensional, seqüenciamento parcial da extremidade N-terminal de proteínas com expressão diferencial, síntese de oligonucleotídeos correspondentes a essa seqüência proteica, para serem utilizados como sondas, e seleção de clones de um banco de cDNAs com sondas marcadas (Lambais, 1996).

A importância dos métodos baseados em proteínas é o fato de medirem os produtos finais do processo de expressão gênica, ao invés dos intermediários (RNAs). Além disso, alguns deles permitem a detecção de modificações pós-transcricionais nas proteínas (como por exemplo fosforilação e glicosilação), proteínas complexas e, em alguns casos, informações sobre a localização das proteínas (Lockhart & Winzeler, 2000).

Por outro lado, os métodos para análise de proteínas são geralmente mais difíceis e menos sensíveis que os baseados em RNAs. Além disso, os níveis de RNAm são imensamente informativos sobre o estado da célula e sobre a atividade dos genes e, para a maioria dos genes, mudanças na abundância de RNAm são relacionados a mudanças na abundância de proteínas (Lockhart & Winzeler, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises moleculares de Xf utilizada nos experimentos

3.1.1 Extração de DNA

A extração de DNA da bactéria foi realizada conforme Ausubel (1992). Uma alíquota de 50mL de suspensão de bactéria em meio PW foi centrifugada por 5 minutos à 18000g. O pélete foi ressuspensionado em 567µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 7,4, EDTA 1mM pH 8,0), adicionou-se SDS (0,5%) e proteinase K (100µg/mL), e incubou-se por 1 hora à 37°C. Foram então adicionados 100µL de NaCl 5M e 80µL de CTAB 10% e incubou-se novamente por 10 minutos à 65°C. Em seguida foram feitas duas etapas de desproteinização: uma com 700µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, vol:vol) e outra com um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, vol:vol:vol). O DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol, mantendo-se à -20°C por 2 horas. O pélete foi lavado com etanol 70% gelado, novamente com etanol absoluto gelado, foi seco e ressuspensionado em 50µL de TE. Adicionou-se 15µg de RNase A e a solução foi incubada por 1 hora à 37°C.

A concentração de DNA foi determinada por espectrofotometria a 260nm ($1 \text{ OD}_{260} = 50\mu\text{g de DNAmL}^{-1}$). Sua integridade foi monitorada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X (Tris 400mM, ácido bórico 400mM, EDTA 10mM) (Sambrook et al., 1989) e coloração com Sybr Green (1:10.000, vol:vol). A visualização do DNA foi feita após varredura em densitômetro a laser "Fluorimage SI" (Amersham Pharmacia Biotech).

3.1.2 Amplificação de fragmento diagnóstico de Xf

Uma alíquota do DNA obtido (30ng) foi utilizada para amplificação por PCR de regiões específicas do genoma de Xf, utilizando-se os iniciadores CVC1 e CVC272-2int. Esse par de iniciadores foi delineado a partir de uma inserção de 28 nucleotídeos,

presente apenas nos isolados de Xf que causam CVC. Essa inserção foi detectada por seqüenciamento de um amplicon de DNA observado somente nos citados isolados, através da análise de RAPD ("Random Amplified Polimorfic DNA") (Pooler & Hartung, 1995).

As amplificações por PCR foram realizadas nas seguintes condições: solução tampão PCR 1X (Gibco-BRL), $MgCl_2$ (Gibco-BRL) 4mM, dNTPs (Gibco-BRL) 200 μ M, iniciadores CVC1 (5'-AGATGAAAACAATCATGCAAA-3') e CVC272-2int. (5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT-3') (0,4 μ M) e 1,0U de DNA polimerase Taq (Gibco-BRL), em volume final de 25 μ L. A amplificação foi realizada em um ciclo à 94°C por 3 minutos, e 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 50°C e 1 minuto à 72°C, e uma extensão final por 4 minutos à 72°C (Pooler & Hartung, 1995).

Os produtos da reação acima foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X, e visualizados conforme descrito no item 3.1.1.

3.2 Determinação da curva de crescimento de *Xylella fastidiosa*

Xylella fastidiosa (Xf), isolado 9a5c, foi cultivada em meio de cultura PW (Davis et al., 1981), sem adição de albumina de soro bovino fração V, pois foi constatado que a retirada desse componente não altera o crescimento da bactéria.

O cultivo da bactéria foi feito em erlenmeyers com capacidade para 125mL, contendo 40mL de meio líquido, numa temperatura de 28°C, sob agitação orbital à 150rpm. A inoculação foi feita com 5mL de uma suspensão de bactérias em PW, apresentando absorbância 0,5375 (600nm).

O crescimento de Xf foi monitorado através de determinação da absorbância das suspensões bacterianas a 600nm, após a adição do inóculo (tempo zero) e 4, 8, 12 e 16 dias após a inoculação, usando-se 3 repetições para cada tempo de incubação.

Foram retiradas alíquotas de 1mL da suspensão de Xf de cada frasco, as quais foram colocadas em microtubos e centrifugadas à 18000g por 10 minutos. O pélete resultante foi ressuspenso em 1mL de solução salina 0,8%, e a absorbância a 600nm foi determinada.

Com o cultivo prolongado, as células de Xf tornavam-se escuras e não se multiplicavam satisfatoriamente, sugerindo que poderiam estar morrendo rapidamente

sob as nossas condições experimentais. Resolveu-se então determinar a porcentagem de células vivas na cultura em relação ao total de células, utilizando-se o kit “LIVE/DEAD® BacLight Bacterial™ Viability” (Molecular Probes).

Este kit é composto por dois corantes de ácidos nucleicos: SYTO9, o qual permeia pela membrana plasmática e emite fluorescência verde, e Propidium iodide (PI), o qual não permeia pela membrana plasmática e emite vermelha. A combinação destes corantes faz com que células com membranas intactas emitam fluorescência verde e que células com membranas danificadas emitam fluorescência vermelha.

O referido kit foi previamente testado determinando-se a viabilidade de células de *Escherichia coli*, durante crescimento em 25mL de meio LB em erlenmeyers com capacidade para 125mL. Foram coletadas alíquotas em diferentes tempos de incubação (zero, 4, 8, 12 e 16 horas), sendo as mesmas ressuspensas em solução salina 0,8% como descrito anteriormente para Xf. A absorbância a 600nm foi determinada. O ensaio foi realizado em microplacas, com as suspensões bacterianas (100µL) sendo misturadas com o mesmo volume de solução dos corantes SYTO9 e Propidium iodine (2X) em ddH₂O. O branco consistiu de solução salina 0,8%, adicionada de mesmo volume da solução dos corantes. As amostras foram incubadas por 15 minutos no escuro e as intensidades de fluorescências a 530nm (verde) e 610nm (vermelho) foram detectadas utilizando-se densitômetro a laser “Fluorimage SI” (Amersham Pharmacia Biotech). As análises foram feitas utilizando-se o programa “Image Quant” (Molecular Dynamics).

A quantificação de células viáveis de Xf foi feita da forma descrita acima, para as amostras dos diferentes tempos de incubação da curva de crescimento.

3.3 Análise da expressão de genes de patogenicidade putativos de Xf

3.3.1 Seleção de genes de interesse

Foram selecionados 20 genes possivelmente relacionados à patogenicidade de Xf. Dentre eles temos os genes *gumC* (XF2369), *gumD* (XF2367) e *gumJ* (XF2362), envolvidos na síntese e secreção de exopolissacarídeos (EPS) associados à virulência de várias bactérias. Também foram selecionados os genes *rpfA* (XF0290), *rpfB* (XF0287), *rpfC* (XF1114) e *rpfF* (XF1115), os quais são tidos como fatores de regulação da patogenicidade em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*,

atuando na regulação da síntese de enzimas extracelulares e EPS. Entre os genes envolvidos na degradação da parede celular vegetal foram selecionados os genes codificando celulase (endo- β -1,4-glucanase) (XF0818), poligalacturonase (precursor de pectinase) (XF2466), protease-RE (XF1823) e protease-serina (XF1851). No caso dos genes envolvidos nos processos de absorção e homeostase do ferro foi selecionado o gene *fur* (XF2344). O gene *rpfA* pode também estar envolvido na homeostase de ferro (Lambais et al., 2000; Simpson et al., 2000).

Dentre os genes possivelmente envolvidos com o mecanismo de percepção de quorum, foram identificados dois genes codificando proteínas contendo domínios típicos de proteínas da família LuxR, denominados *luxR/UHPA* (XF2608) e *pluxR* (XF0972). Supõe-se que esses genes estejam envolvidos num mecanismo de percepção de quorum, muito embora o gene para a síntese do autoindutor, homólogo a *luxI*, não tenha sido identificado em Xf (Lambais et al., 2000).

Entre os genes relacionados à secreção ou exportação de proteínas, foram selecionados *xpsK* (XF1523) e *xpsL* (XF1524) (Dums et al., 1991).

Outros genes selecionados foram o gene *mdoH* (XF1623), o qual regula a biossíntese de glicanas periplasmáticas relacionadas à patogenicidade em *Pseudomonas syringae* (Loubens et al., 1993), e o gene *rpoN* (XF1408), o qual codifica o fator sigma 54, essencial para a ativação da RNA polimerase e transcrição de genes específicos em condições de estresse (e.g. falta de nitrogênio no meio), ou em interações fitopatogênicas (e.g. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* e *Nicotiana tabacum*) (Fellay et al., 1991).

Foram selecionados ainda os genes *rsmA* (XF0125) e *rsmB* (XF0928), os quais controlam a produção de enzimas extracelulares, antibióticos, pigmentos, polissacarídeos, e também os níveis de lactonas de homoserina aciladas (envolvidas no mecanismo de percepção de quorum) em várias espécies de *Erwinia* (Cui et al., 1999).

Para a normalização dos sinais foi selecionado o gene do rRNA16S, como controle constitutivo.

3.3.2 Delineamento de iniciadores gene-específicos

Através do programa Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi.bin/primer/Primer3.cgi>), foram delineados iniciadores internos para os genes selecionados, utilizando-se, de maneira geral, os seguintes parâmetros:

- Porcentagem de GC: entre 40 e 60%;
- Tamanho do fragmento amplificado: entre 500 e 700pb;
- Tamanho dos iniciadores: entre 15 e 20pb, com ótimo em 18pb;
- Complementariedade da região 3': valor máximo de 2,0.

Na Tabela 1 são apresentados os genes selecionados, a denominação e o tamanho do ORF (“Open reading frame”-quadro aberto de leitura) de Xf que representa cada gene, seus iniciadores internos específicos e o tamanho do produto de PCR gerado pelos mesmos.

3.3.3 Amplificação de fragmentos dos genes de interesse

Fez-se um levantamento dos cosmídios utilizados no seqüenciamento do DNA de Xf pelo Projeto Genoma Xf da FAPESP, onde estavam contidos os ORFs de interesse, e os mesmos foram solicitados à FAPESP.

As bactérias contendo os cosmídios de interesse foram cultivadas em meio LB líquido contendo canamicina ($30\mu\text{g mL}^{-1}$ de meio). Utilizou-se uma alíquota de 1,5mL da cultura para a extração de DNA. Este volume foi transferido para microtubos e centrifugado à 18000g por 5 minutos à 4°C. Ao pélete adicionou-se 100 μL da solução 1 gelada (Tris-HCl 25mM pH 8,0, EDTA 10mM pH 8,0, glicose 50mM) e agitou-se vigorosamente. Em seguida, 200 μL da solução 2 (SDS 1%, NaOH 0,2N) foi adicionado e misturado por inversão. Os tubos foram mantidos no gelo por 10 minutos, e então foi adicionado 150 μL da solução 3 (acetato de potássio 3M, ácido acético glacial 10%), misturando-se por inversão. Manteve-se os tubos em gelo por 10 minutos e, após este período, centrifugou-se à 18000g por 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos, adicionou-se 15 μg de RNase A, e incubou-se à 37°C por 20

Tabela 1. Genes de *Xylella fastidiosa* selecionados para análise de expressão

ORF	Gene	Iniciadores		Fragmento
	Tamanho (kb)	Nome	Seqüência (5' → 3')	amplificado (pb)
XF-0818	Celulase	cel-a	aacagcaacacatcaccga	651
	1,779	cel-b	cttaccaccgaactcacaa	
XF-2344	<i>fur</i>	fur-a	cggatgctaaacggtcca	412
	0,495	fur-b	ccaacgagtgttcttccaa	
XF-2369	<i>gumC</i>	gumC-a	gcctccgcacagaatga	570
	1,404	gumC-b	caaacccaaaaagacaccaa	
XF-2367	<i>gumD</i>	gumD-a	ttttcccgttgtatcgca	620
	1,455	gumD-b	ccgccctgacgaagatta	
XF-2362	<i>gumJ</i>	gumJ-a	agatgcgtttcggtcagc	544
	1,533	gumJ-b	cgccactttcaccaagg	
XF-2608	<i>luxR/UHPA</i>	luxR-a	cgaagtgatagggaagcg	523
	0,663	luxR-b	caaccgagccagagcaat	
XF-1623	<i>mdoH</i>	mdoH-a	ctgctgatgttggtggc	591
	1,848	mdoH -b	tggtgctgttcctctgg	
XF-0972	<i>pLuxR</i>	pluxR-a	tgaccatccactatttcgca	510
	0,633	pluxR-b	acggtgtttccgcaa	
XF-2466	Poligalacturonase	pectin-a	tccccctagtctttggactg	500
	0,525	pectin-b	gtggtgttgatcgcgga	
XF-1851	Protease-Serina	serprot-a	tccgcatccaaaacaactc	552
	3,003	serprot-b	gacatcgccccaatcaaa	
XF-1823	Protease-RE	protRE-a	cggcaagaaagacaccca	501
	2,184	protRE-b	ccaatcaccaaaccacgc	

Tabela 1. Genes de *Xylella fastidiosa* selecionados para análise de expressão

ORF	Gene Tamanho (kb)	Iniciadores		Fragmento amplificado (pb)
		Nome	Seqüência (5' → 3')	
XF-0290	<i>rpfA</i>	rpfA-a	cactcgggttctacgtggtt	572
	2,727	rpfA-b	tgacaggctcagttgcatc	
XF-0287	<i>rpfB</i>	rpfB-a	ccaactgcctcgctcaat	624
	1,71	rpfB-b	atgcctctggtgatgcct	
XF-1114	<i>rpfC</i>	rpfC-a	ttgggaatgcgggct	503
	1,989	rpfC-b	cacgggttgacaggaa	
XF-1115	<i>rpfF</i>	rpfF-a	attggactatgcctgccg	570
	0,873	rpfF-b	ggagtgattgctgccga	
XF-1408	<i>rpoN</i>	rpoN-a	gccccgttatccgtagatg	614
	1,389	rpoN-b	gaatcccgttggtgacg	
XF-0125	<i>rsmA</i>	rsmA-a	tgatcctgactcgtcgttct	206
	231	rsmA-b	gaagagccgctatctcccc	
XF-0928	<i>rsmB</i>	rsmB-a	cgctcgctcaagacgga	685
	1,266	rsmB-b	cggcacacgcatcaa	
XF-1523	<i>xpsK</i>	xpsK-a	tcggttgctctctcgg	630
	0,846	xpsK-b	ctgcccactctgttgctc	
XF-1524	<i>xpsL</i>	xpsL-a	agtgggatgtgttgccg	658
	1,155	xpsL-b	ccaaatagggtgccgttcg	
	16SRNA	16SRNA-a	aggcagcagtggggaat	760
	1,545	16SRNA-b	gctcgttgccggactta	

minutos. O DNA foi precipitado com etanol 100% gelado e mantido no gelo por 5 minutos. Centrifugou-se à 18000g por 20 minutos à 4°C, e lavou-se o pélete em etanol 70% gelado. O pélete foi então seco e ressuspendido em 30µL de água ultrapura e esterilizada.

A concentração de DNA foi determinada através de espectrofotometria a 260nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X, conforme descrito no item 3.1.1.

Uma alíquota de 50ng de DNA foi utilizada para amplificação de fragmentos dos genes de interesse, através de PCR. A amplificação foi feita em solução tampão PCR 1X (Gibco-BRL), MgCl₂ (Gibco-BRL) 4mM, dNTPs (Gibco-BRL) 200µM, 0,4µM de cada iniciador e 1,0U de DNA polimerase Taq (Gibco-BRL), em volume final de 25µL.

Para a amplificação do rDNA16S, utilizou-se 20ng de DNA genômico de Xf, uma vez que não foi possível obter o cosmídio onde o mesmo estava contido.

A amplificação foi realizada em um ciclo à 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 60°C e 3 minutos à 72°C, seguidos de extensão final por 4 minutos à 72°C.

Para amplificação do gene *gumC*, foi utilizada temperatura de pareamento de 50°C. Dessa forma, a reação deu-se em um ciclo à 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 50°C e 1 minuto à 72°C, seguidos de extensão final por 4 minutos à 72°C.

Os produtos de amplificação (amplicons) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X, conforme descrito no item 3.1.1, e quantificados por comparação com padrão de massa ("Low DNA mass ladder", Gibco - BRL), utilizando-se o programa "Fragment Analysis" (Molecular Dynamics).

3.3.4 Sub-clonagem dos amplicons de interesse

A subclonagem dos amplicons de interesse foi feita utilizando-se o "SureClone™ Ligation kit" (Amersham Pharmacia Biotech). Esse processo de clonagem consta das seguintes etapas: reparo das extremidades dos amplicons com as enzimas Klenow e Polinucleotídeo quinase, purificação do inserto, e ligação com o vetor pUC18-SmaI/BAP, através da ação da enzima DNA ligase T4.

Células competentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas com o vetor contendo o amplicon de interesse e, após plaqueamento em meio LB-ágar contendo ampicilina (75 μ g/mL), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactoside) e IPTG (isopropiltio- β -D-galactoside), foram selecionadas colônias brancas, que possuíam o plasmídio ligado ao inserto de interesse.

3.3.5 Confirmação da identidade dos clones selecionados

A seleção de clones contendo os genes de interesse foi feita através de reação de PCR, utilizando-se diretamente as colônias brancas obtidas na placa de seleção com X-Gal e IPTG. Para cada gene, selecionou-se 3 clones com resultado positivo na reação de PCR, os quais foram seqüenciados para confirmação de sua identidade.

Os clones selecionados foram cultivados em meio LB líquido contendo ampicilina (75 μ g mL⁻¹). Uma alíquota de 1,5mL da cultura foi utilizada para a extração do DNA plasmidial. A extração foi feita como descrito no item 3.3.3.

A concentração e integridade do DNA foram determinadas através de eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X, conforme descrito no item 3.1.1.

Uma alíquota de 100ng de DNA foi utilizada para amplificação por PCR, utilizando-se o "DNA Sequencing Kit - Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Perkin Elmer Applied Biosystems), e os iniciadores universais M13/pUC-*Reverse* (5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3') e M13/pUC-*Forward* (5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3') (Gibco - BRL) conforme metodologia utilizada no projeto GENOMA / FAPESP. Os fragmentos gerados foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando-se seqüenciador automático ABI-377 (Perkin Elmer).

As seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências do banco de dados de Xf (<http://www.lbi.dcc.unicamp.br/services/index.html>), para confirmar sua identidade. Selecionou-se, então, um clone para cada gene para as próximas etapas de trabalho.

3.3.6 Amplificação dos fragmentos dos genes

Uma alíquota de 20ng de DNA plasmidial de cada clone selecionado foi utilizada para amplificação de fragmentos dos genes, através de PCR, em solução contendo tampão PCR 1X (Gibco-BRL), $MgCl_2$ (Gibco-BRL) 4mM, dNTPs (Gibco-BRL) 200 μ M, 0,4 μ M de cada iniciador e 1,0U de DNA polimerase Taq (Gibco-BRL), em volume final de 50 μ L. Inicialmente, misturou-se o DNA plasmidial e os iniciadores para cada gene. A mistura foi aquecida à 95°C por 5 minutos, mantida em gelo até o resfriamento e, após esse período, foram adicionados os demais reagentes. A amplificação foi realizada usando-se os ciclos descritos no item 3.3.3.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X, conforme descrito no item 3.1.1, e quantificados por comparação com padrão de massa ("Low DNA mass ladder", Gibco - BRL), utilizando-se o programa "Fragment Analysis" (Molecular Dynamics).

3.4 Extração de RNA total de Xf

Subamostras de suspensões de Xf sob condições de baixa densidade celular (4 dias de cultivo) e alta densidade celular (12 dias de cultivo) foram utilizadas para a extração de RNA total de acordo com Rhodius (www.microarrays.org/protocols.html).

As células foram coletadas pipetando-se 10mL da cultura bacteriana em tubo contendo 1,25mL de solução 5% de fenol saturado com água (pH menor que 7,0) em etanol absoluto gelada. As células foram centrifugadas à 6800g por 2 minutos à 4°C e o sobrenadante foi descartado. Para o armazenamento das amostras, o pélete foi congelado em nitrogênio líquido e estocado à -80°C.

As células foram lisadas ressuspendendo-se o pélete em 800 μ L de solução contendo 0,4mg de lisozima em TE pH 8,0, preparada no momento do uso. Adicionou-se 80 μ L de solução SDS 10% e a amostra foi incubada à 64°C por 2 minutos. Após a incubação, um volume de 80 μ L de solução acetado de sódio 1M pH 5,5 foi adicionado. Adicionou-se então volume igual de fenol saturado com água (1mL), os tubos foram invertidos e incubados à 64°C por 6 minutos, invertendo-se as amostras a cada 40 segundos. Os tubos foram colocados em gelo para resfriar, e centrifugados à 20000g por 10 minutos à 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubos novos, adicionou-se

volume igual de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, vol:vol), e centrifugou-se à 20000g por 5 minutos à 4°C. A fase aquosa foi precipitada com acetato de sódio 300mM pH 5,5, EDTA 1mM e 2,5 volumes de etanol, durante toda a noite à -20°C. Os péletes foram lavados em 1mL de etanol 80%, secos ao ar durante 15 - 20 minutos, e ressuspensos em 100µL de água tratada com dietil pirocarbonato (DEPC).

As amostras de RNA total foram tratadas com 10U DNase I livre de RNase (Boehringer Mannheim), 40U de inibidor de RNase (Stratagene), em Tris-HCl 20mM pH8,4, KCl 50mM e MgCl₂ 20mM, incubando-se por 1,5h à 37°C. O RNA foi então extraído uma vez com fenol saturado em água, uma vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, vol:vol:vol), e duas vezes com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; vol:vol). O sobrenadante foi precipitado com acetato de sódio 300mM pH 5,5 e 2,5 volumes de etanol, durante toda a noite à -20°C. Os péletes foram lavados em 1mL de etanol 80%, secos ao ar durante 15 - 20 minutos, e ressuspensos em 50µL de água tratada com DEPC.

A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria a 260nm ($1 \text{ OD}_{260} = 40\mu\text{g de RNA mL}^{-1}$). A qualidade do RNA foi determinada através das razões A_{260} / A_{280} e A_{260} / A_{230} . A integridade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1,2%, utilizando-se brometo de etídeo ($0,5\mu\text{g mL}^{-1}$) para visualização do mesmo (Sambrook et al., 1989). A aquisição da imagem dos géis foi feita em densitômetro a laser "Fluorimage SI" (Amersham Pharmacia Biotech).

3.5 Síntese da primeira fita de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi feita com o kit "SUPERScript™ Preamplification system for first strand cDNA synthesis" (Gibco-BRL), conforme instruções do fabricante. Partiu-se de 2µg de RNA total de cada tratamento (baixa e alta densidade celular), 100ng dos hexaoligonucleotídeos iniciadores aleatórios e água tratada com DEPC para volume final de 12µL. A solução foi aquecida à 70°C por 10 minutos e resfriada em gelo por 1 minuto. Adicionou-se, então, tampão PCR 1X, MgCl₂ 2,5mM, dNTPs 500µM e DTT 10mM. As amostras foram incubadas por 5 minutos à 25°C e, em seguida, adicionou-se 200U de transcritase reversa Superscript II. Incubou-se por 10 minutos à 25°C, 50 minutos à 42°C e, em seguida, as enzimas foram

inativadas à 70°C por 15 minutos. Foram adicionadas 2U de RNaseH às reações e incubou-se por 20 minutos à 37°C, para a degradação das fitas de RNA dos híbridos cDNA:RNA formados. As soluções de cDNA foram armazenadas à -20°C.

3.6 Análise da expressão dos genes selecionados

3.6.1 Análise da expressão dos genes selecionados por "Northern blot" reverso

Uma alíquota de 800ng dos produtos de PCR obtidos na reação descrita no item 3.3.6 foi desnaturada através da adição de NaOH 0,4M e EDTA 10mM, e aquecimento à 100°C por 10 minutos. A solução de DNA foi neutralizada através da adição de volume igual de solução de acetato de amônio 2M pH 7,0 gelada, e mantida em gelo.

As amostras, em duplicata, foram transferidas sob vácuo para membranas de náilon carregadas positivamente (Boehringer Mannheim) pré-equilibradas em SSC 6X (NaCl 0,9M, citrato de sódio 90mM) durante 30 minutos. Um volume de 500µL de NaOH 0,4M foi aplicado sob vácuo em cada cavidade do aparato de transferência, para assegurar a desnaturação do DNA. As membranas foram lavadas em SSC 2X, e o DNA foi fixado à 120°C por 20 minutos.

A primeira fita de cDNA foi marcada com fosfatase alcalina utilizando-se o kit "Alkphos direct labelling kit" (Amersham Pharmacia Biotech), conforme instruções do fabricante. Trata-se de um sistema baseado na conjugação de uma fosfatase alcalina termoestável diretamente ao cDNA, através de uma reação de ligação cruzada contendo formaldeído e azida de sódio, e detecção através de dioxetano quimioluminescente.

Uma alíquota de aproximadamente 200ng da primeira fita de cDNA de cada tratamento foi desnaturada à 100°C por 5 minutos e mantida em gelo por 5 minutos. Adicionou-se 20µL do tampão de reação, 4µL do reagente de marcação e 20µL da solução de "cross-linker" diluída 5X, num volume total de 84µL. As reações foram incubadas à 37°C durante 30 minutos, e mantidas em gelo até serem adicionadas aos respectivos tampões de hibridização.

As membranas foram pré-hibridizadas no tampão de hibridização fornecido pelo kit, adicionado de NaCl até concentração 0,5M e reagente de bloqueio a 4%, durante 2 horas à 55°C. A hibridização foi feita à 55°C durante toda a noite, na mesma

solução contendo as respectivas sondas. Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem primária (uréia 2M, SDS 0,1%, fosfato de sódio 50mM pH 7,0, NaCl 150mM, MgCl₂ 1mM, reagente de bloqueio 0,2%) durante 15 minutos à 55°C. A seguir foram lavadas duas vezes em tampão de lavagem secundária (Tris 50mM, NaCl 100mM, MgCl₂ 2mM) durante 5 minutos à temperatura ambiente.

A detecção foi feita com o reagente "CDP-Star", incubando-se por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, o excesso de reagente foi drenado, e as membranas foram expostas a filme de raio-X (Hiperfilm-ECL - Amersham Pharmacia Biotech) por 30 a 90 minutos, conforme a necessidade.

A aquisição das imagens das membranas foi feita com densitômetro "Personal Densitometer SI" (Molecular Dynamics), e as análises foram feitas com o programa "Image Quant" (Molecular Dynamics), determinando-se a área do pico emitido por cada sinal.

O experimento foi repetido, sob as mesmas condições, para a amostra de alta densidade celular. No caso da amostra de baixa densidade celular, não foi possível repetir o experimento, pois não havia quantidade suficiente de RNA total desta amostra.

3.6.2 Análise da expressão dos genes selecionados através de RT-PCR

As análises de RT-PCR foram feitas utilizando-se diluições 1:50 e 1:100 da solução de cDNA de fita simples das amostras de baixa de alta densidade celular.

Um volume de 1µL de cada diluição de cDNA das duas amostras foi utilizado para as amplificações por PCR, sendo feita também uma reação sem DNA para servir como controle negativo. As reações foram feitas em duplicata, para cada gene, sendo usadas amostras de cDNA sintetizadas em experimentos diferentes. As reações eram compostas de solução tampão PCR 1X (Gibco-BRL), MgCl₂ (Gibco-BRL) 4mM, dNTPs (Gibco-BRL) 200µM, iniciadores específicos de cada gene (0,4µM) e 0,5U de DNA polimerase Taq PLATINUM® (Gibco-BRL), em volume final de 25µL. A amplificação foi realizada através dos ciclos descritos no item 3.3.3. No caso do gene *gumC*, como não obteve-se amplificação utilizando-se as condições citadas acima, foi feita outra reação de PCR com temperatura de pareamento de 50°C, também descrita no item 3.3.3.

Os produtos das reações de PCR foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,2% - TBE 0,5X, e visualizados conforme item 3.1.1. As análises densitométricas dos géis foram feitas utilizando-se densitômetro a laser "Fluorimage SI" (Amersham Pharmacia Biotech) e o programa "Image Quant" (Molecular Dynamics).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises moleculares de Xf utilizada nos experimentos

A caracterização genética do isolado de Xf utilizado nos experimentos, através de PCR com os iniciadores CVC1 e CVC272-2int., confirmou tratar-se de *Xylella fastidiosa* causadora de CVC. O produto obtido é um fragmento com 500pb (Figura 1), característico da estirpe 9a5c, utilizada no Projeto Genoma (Li et al., 1999; Simpson et al., 2000).

4.2 Determinação da curva de crescimento de *Xylella fastidiosa*

A curva de crescimento de Xf em meio de cultura PW, com base na densidade ótica (DO) a 600nm e na concentração de DNA, determinada por ligação ao corante SYTO9, pode ser vista na Figura 2. Nas condições experimentais utilizadas, a fase exponencial (log) inicia-se após 4 dias de cultivo, e a fase estacionária inicia-se com aproximadamente 10 dias de cultivo. A quantidade de DNA na cultura de Xf aumenta durante a fase log, decrescendo a partir do 12º dia de cultivo. Os dados de fluorescência a 530nm e DO a 600nm apresentam correlação positiva ($r=0,84$), indicando que a DO a 600nm pode ser usada para monitorar o crescimento de Xf em meio líquido.

A figura 3 mostra a curva de crescimento de Xf em meio de cultura PW, com base na DO a 600nm, e a porcentagem de células viáveis da bactéria nos diferentes tempos de cultivo. A porcentagem de células viáveis, determinada com SYTO9 e Propidium iodide, nas culturas de Xf ao longo do tempo de incubação revelou que a viabilidade das células em meio PW diminui consideravelmente quando a cultura entra na fase estacionária de crescimento. No início da fase exponencial (4 dias de incubação), 98% das células eram viáveis. Já no início da fase estacionária (aproximadamente 10 dias de incubação), a viabilidade das células diminui para aproximadamente 50%, atingindo cerca de 30% depois de 16 dias de cultivo.

Figura 1 - Produto da amplificação do DNA de Xf por PCR com os iniciadores CVC1 e CVC272-2int. **MM**: Marcador de massa molecular ("100bp Molecular Marker", Gibco - BRL); **C-**: Controle negativo (sem DNA); **Xf**: Produto da amplificação do DNA de Xf (500pb).

Figura 2 - Crescimento e concentração de DNA de *Xylella fastidiosa* em meio de cultura PW líquido. O crescimento de Xf foi determinado pela absorvância da suspensão bacteriana a 600nm, e a concentração de DNA foi determinada a partir de ligação ao corante SYTO9. Os dados são médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão da média.

Figura 3 - Crescimento e viabilidade de *Xylella fastidiosa* em meio de cultura PW líquido. O crescimento de Xf foi determinado pela absorbância da suspensão bacteriana a 600nm, e a viabilidade das células ao longo do crescimento foi determinada utilizando-se os corantes SYTO9 e Propidium iodide. Os dados são médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão da média.

Como o sistema de detecção de células viáveis e não viáveis é altamente eficiente para a distinção entre células com membranas intactas e células com membranas comprometidas (Auty et al., 2001; Bunthof et al., 2001), os dados sugerem que o aumento da DO da cultura não está relacionado somente com o aumento do número de células viáveis, mas também com o aumento de células inviáveis, e que Xf possui um tempo de vida curto em meio PW.

Redução da porcentagem de células viáveis na fase exponencial de crescimento também foi observado em cultivo de *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus mutans*, utilizando SYTO9 e Propidium iodide (Decker, 2001).

Essa diminuição da viabilidade das células não foi observada em *Escherichia coli*. Para essa bactéria, a porcentagem de células viáveis aumenta com o tempo de incubação, sendo máxima ao final da fase log de crescimento (Figura 4). Esses dados podem refletir as diferenças na fisiologia de crescimento de cada bactéria, uma vez que *E. coli* apresenta uma taxa alta de crescimento em meio de cultura, enquanto Xf apresenta baixa taxa de crescimento. Em *E. coli*, reduções graduais de viabilidade celular tem sido observadas na fase estacionária de crescimento (Kolter et al., 1993).

É provável que o meio de cultura PW apresente uma composição química não favorável ao crescimento de Xf, e que essa redução de viabilidade pode estar associada à ausência de fatores de crescimento específicos.

Em *E. coli*, a adaptação à fase estacionária é acompanhada por mudanças no padrão de expressão gênica global. Aproximadamente 1.000 genes altamente expressos na fase exponencial de crescimento são desligados ou reprimidos na fase estacionária, e um grupo de 50-100 genes que são suprimidos nas células em crescimento, começam a ser expressos quando as células entram na fase estacionária (Ishihama, 1997).

As mudanças no padrão de expressão gênica de *E. coli* associadas à fase estacionária são principalmente mediadas pela modulação da especificidade da enzima RNA polimerase, que passa a reconhecer o fator σ^S ou σ^{38} , ao invés do fator σ^{70} . De fato, a concentração intracelular de σ^S aumenta quando as células param de crescer (Ishihama, 1997).

Figura 4 - Crescimento e viabilidade de *Escherichia coli* em meio de cultura LB líquido. O crescimento de *E.coli* foi determinado pela absorbância da suspensão bacteriana a 600nm, e a viabilidade das células ao longo do crescimento foi determinada utilizando-se os corantes SYTO9 e Propidium iodide. Os dados são médias de 3 repetições $\pm$ desvio padrão da média.

A funcionalidade da holoenzima RNA polimerase é modulada pela interação de aproximadamente 100 diferentes fatores de transcrição com uma de suas subunidades (Ishihama, 1997). Esses fatores de transcrição podem atuar ativando ou suprimindo a expressão gênica, dependendo do local onde estes se ligam ao DNA (Choy et al., 1995).

A exposição de várias bactérias gram-negativas a períodos prolongados de "fome" induz programas alternativos de expressão gênica, resultando numa transição para a condição dormente, quando as células são denominadas "viáveis mas não cultiváveis" (Nyström, 2001). O conhecimento de como as espécies patogênicas reagem à limitação nutricional é importante para sua detecção e disseminação (Turner et al., 2000). As células que sobrevivem durante a fase estacionária, mantêm-se viáveis devido à liberação de nutrientes pelas células mortas (Kolter et al., 1993). Os dados obtidos indicam que *Xf* em meio de cultura PW não entra no estado "viável mas não cultivável", já que ocorre diminuição da viabilidade das células, ou seja, as células tornam-se inviáveis.

Outra característica apresentada pelas bactérias gram-negativas durante a fase estacionária é o fato de perderem seu formato familiar de bastão, encontrado por exemplo em células de *E. coli* em crescimento. As células tornam-se muito menores e quase esféricas, como resultado de diversas divisões celulares sem um aumento na massa celular (Kolter et al., 1993). Mudanças no envelope celular que resultam do "estado de fome" refletem a necessidade de proteção contra um ambiente estressante. A superfície das células durante a manutenção deste estado é recoberta com moléculas mais hidrofóbicas que favorecem a adesão e a agregação (Kjelleberg et al., 1987). As membranas tornam-se menos fluídas e menos permeáveis, devido a mudanças na composição de ácidos graxos. O cromossomo sofre mudanças topológicas consistentes com a redução da expressão gênica observada nessas células (Kolter et al., 1993).

Muitas funções induzidas durante a fase estacionária também são induzidas quando as células crescem com um tempo longo de duplicação: vários promotores induzidos durante a fase estacionária mostram expressão inversamente proporcional à razão de crescimento (Kolter et al., 1993). *Xf* possui um tempo de duplicação *in vitro* entre 10 a 48 horas (Wells et al., 1987), podendo desta forma

apresentar as mudanças descritas acima, mesmo antes de atingir a fase estacionária de crescimento.

Na interação Xf-citrus, as baixas populações de células bacterianas cultiváveis em plantas com sintomas de CVC, comparadas com plantas de videira com mal de Pierce, sugerem que a maioria das células de Xf no interior das plantas de citrus sintomáticas podem estar mortas (Almeida et al., 2001).

4.3 Amplificação de fragmentos dos genes de interesse

A Figura 5 mostra os fragmentos dos genes de interesse amplificados por PCR, a partir do DNA plasmidial de clones selecionados, usando-se os iniciadores gene-específicos. Pode-se observar que os fragmentos obtidos possuem os respectivos tamanhos esperados, conforme listado na Tabela 1.

A análise feita com o programa "Fragment Analysis" (Molecular Dynamics), através de comparação com o marcador de massa "Low DNA mass ladder" (Gibco - BRL), permitiu a determinação do tamanho e concentração de cada fragmento. A partir da concentração estimada, foram calculadas as quantidades necessárias de cada fragmento para a transferência para membrana de náilon, e posterior análise da expressão gênica.

4.4 Extração de RNA total de Xf

Tao et al. (1999) relatam que células com crescimento rápido contém proporcionalmente RNAs mais estáveis, incluindo RNAs ribossômicos (rRNAs) e RNAs transportadores (tRNAs). A razão para este aumento de RNAs estáveis é simples: para crescer mais rápido, as bactérias precisam sintetizar proteínas de maneira mais rápida também, e para isso necessitam de maiores quantidades de rRNA e tRNA.

Embora Xf apresente crescimento lento em meio de cultura, o método de Rhodius permitiu a obtenção de material de qualidade em quantidades adequadas. O RNA total de Xf extraído através desse método pode ser visualizado na Figura 6. A integridade do RNA é demonstrada pela presença das bandas correspondentes aos rRNAs 23 e 16S.

O tratamento com DNase foi realizado para certificar que as amostras estavam isentas de contaminação por DNA genômico. Trata-se de uma etapa muito importante para as análises de expressão gênica, pois uma possível contaminação

Figura 5 - Produtos da amplificação do DNA dos clones por PCR com os iniciadores gene-específicos: **1.** celulase (651pb); **2.** *fur* (412pb); **3.** *gumC* (570pb); **4.** *gumD* (620pb); **5.** *gumJ* (544pb); **6.** *luxR* (523pb); **7.** *mdoH* (591pb); **8.** *pluxR* (510pb); **9.** poligalacturonase (500pb); **10.** protease-serina (614pb); **11.** protease-RE (552pb); **12.** *rpfA* (501pb); **13.** *rpfB* (572pb); **14.** *rpfC* (624pb); **15.** *rpfF* (503pb); **16.** *rpoN* (570pb); **17.** *rsmA* (206pb); **18.** *rsmB* (685pb); **19.** *xpsK* (630pb); **20.** *xpsL* (658pb); **21.** 16SRNA (760pb); **MM:** Marcador de massa molecular ("Low DNA mass ladder", Gibco - BRL).

Figura 6 - RNA total de Xf extraído a partir de culturas em meio PW sob condições de baixa e alta densidade celular: **1 e 2)** Culturas sob condições de baixa e alta densidade celular, respectivamente, tratadas com DNase; **3 e 4)** Culturas sob condições de baixa e alta densidade celular, respectivamente, antes do tratamento com DNase; **MM:** Marcador molecular ("RNA ladder", Gibco-BRL).

poderia comprometer os resultados obtidos nas futuras etapas. Os dados mostram que a integridade do RNA foi mantida após o tratamento com DNase (Figura 6).

4.5 Análise da expressão dos genes selecionados por “Northern blot” reverso e RT-PCR

Os sinais obtidos para cada gene, após a hibridização com as sondas de cDNA sintetizadas a partir de RNA total de culturas de Xf sob condições de baixa e alta densidade celular, podem ser vistos na Figura 7. Já a figura 8 traz os valores de intensidade dos sinais de hibridização, normalizados com base na intensidade do sinal obtido para o gene codificando o rRNA16S.

Todos os genes, exceto *luxR/UHPA* (XF-2608), poligalacturonase (precursor de pectinase) (XF-2466), *rpfC* (XF-1114) e *rsmB* (XF-0928) apresentaram expressão em culturas de Xf sob condições de baixa e alta densidade celular em meio PW.

Sob as condições experimentais utilizadas, os genes *fur* (XF-2344), *gumC* (XF-2369), protease-serina (XF-1851) e *rsmA* (XF-0125) tiveram sua expressão significativamente suprimida sob condições de alta densidade celular ($p < 0,05$). Já a expressão de *rpfF* (XF-1115) foi induzida significativamente ($p < 0,06$) sob condições de alta densidade celular. Os genes *gumD* (XF-2367), *gumJ* (XF-2362) e *rpfA* (XF-0290) tiveram a expressão detectada somente sob condições de alta densidade celular, enquanto a expressão de *rpfB* (XF-0287) foi detectada somente sob condições de baixa densidade celular. A expressão de celulase (endo- β -1,4-glicanase) (XF0818), *mdoH* (XF-1623), *pluxR* (XF-0972), protease-RE (XF-1823), *rpoN* (XF-1408), *xpsK* (XF-1523) e *xpsL* (XF-1524) não foi afetada significativamente pela densidade populacional em meio PW.

Para verificar se os transcritos não detectados pela análise de “Northern blot” reverso realmente não estavam presentes nas populações de RNAs de Xf sob condições de baixa e alta densidade celular, ou se a metodologia utilizada para marcação das sondas de cDNA não foi suficientemente sensível, uma análise de expressão por RT-PCR foi realizada. A Figura 9 mostra os resultados da amplificação por RT-PCR com iniciadores específicos de cada gene de interesse, usando como DNA molde as primeiras fitas de cDNA numa diluição 1:100, obtidas a partir de culturas de Xf sob condições de baixa e alta densidade celular.

Figura 7 - Resultado das hibridizações com sondas de cDNA obtidas a partir de RNA total de Xf em meio PW sob condições de baixa densidade celular **(A)**; alta densidade celular **(B)**; Controle positivo: 16SRNA **(C)**. Amostras em **A** e **B**: **a1**: celulase; **b1**: *fur*; **c1**: *gumC*; **d1**: *gumD*; **e1**: *gumJ*; **a2**: *luxR*; **b2**: *mdoH*; **c2**: *pluxR*; **d2**: poligalacturonase; **e2**: protease-serina; **a3**: protease-RE; **b3**: *rpfA*; **c3**: *rpfB*; **d3**: *rpfC*; **e3**: *rpfF*; **a4**: *rpoN*; **b4**: *rsmA*; **c4**: *rsmB*; **d4**: *xpsK*; **e4**: *xpsL*. Amostras em **C**: **a1**: 16SRNA em baixa densidade celular; **b1**: 16SRNA em alta densidade celular.

Figura 8 - Intensidade relativa dos sinais de hibridização obtidos para cada gene de interesse em análises de “Northern blot” reverso, utilizando sondas de cDNA obtidas a partir de RNA total de culturas de Xf sob condições de baixa densidade celular (**BDC**) ou alta densidade celular (**ADC**). A intensidade dos sinais de hibridização foi obtida por análise densitométrica das autorradiografias, usando o programa "Image Quant" (Molecular Dynamics). Os dados foram normalizados em função do sinal do gene 16SRNA. Os valores obtidos são médias de 2 repetições $\pm$ desvio padrão da média para BDC, e médias de 4 repetições $\pm$ desvio padrão da média para ADC. As amostras marcadas com asterisco apresentaram expressão diferencial (indução ou supressão) sob condições de alta densidade celular ($p < 0,06$).

Figura 9 - Produtos da amplificação dos genes de interesse por RT-PCR com iniciadores específicos, a partir de RNA obtido de culturas de Xf sob condições de baixa densidade celular (**BDC**) e alta densidade celular (**ADC**). **Gel 1 e 2:** Repetições das reações de PCR, usando cDNAs sintetizados em reações diferentes.

Nas análises de expressão por RT-PCR utilizando soluções de cDNA na diluição 1:50, transcritos de todos os genes, exceto *gumC*, foram detectados (dados não apresentados). Se todos os genes foram detectados em diluição 1:50, então a síntese de cDNA com iniciadores aleatórios foi eficiente. No caso do gene *gumC*, para o qual não se obteve amplificação com nenhuma das diluições de cDNA, mesmo usando temperatura de pareamento de 50°C, o fragmento do seu cDNA sintetizado com iniciadores aleatórios pode não conter a região de ligação de um dos iniciadores utilizados no RT-PCR.

A não-amplificação do gene *gumC*, e de outros genes usando cDNA na diluição 1:100 (Figura 9), vem confirmar que não houve contaminação do RNA total com DNA genômico, e que os dados obtidos representam a quantidade de transcritos nas células.

Na maioria dos casos, os resultados obtidos por análise de “Northern blot” reverso e RT-PCR são congruentes. No entanto, os resultados do RT-PCR não são quantitativos e devem ser interpretados com restrições.

Os genes *gumC*, *gumD* e *gumJ* estão envolvidos na síntese e secreção de EPS associados à virulência em várias bactérias fitopatogênicas, podendo promover a adesão das bactérias a superfícies dos hospedeiros (Lambais et al., 2000; Simpson et al., 2000).

Em *Xcc*, o polissacarídeo extracelular é denominado goma xantana. Nesse caso, *gumD* está envolvido na junção dos glicolipídios intermediários, enquanto *gumC* e *gumJ* podem estar envolvidos na polimerização e translocação do EPS (Dow & Daniels, 2000). O produto do gene *gumD* é, provavelmente, responsável pelo primeiro passo da biossíntese de xantana (Dow & Daniels, 2000; Katzen et al., 1998). *gumC* influencia o grau de polimerização, sendo que mutação em *gumB* ou *gumC* é letal no tipo selvagem, devido aos efeitos tóxicos do acúmulo de glicolipídios intermediários da biossíntese de xantana (Katzen et al., 1998).

Em *Xf*, o polissacarídeo extracelular é denominado goma fastidiana, e a organização dos genes envolvidos em sua síntese são muito similares aos observados em *Xcc* (Katzen et al., 1998; Silva et al., 2001).

A expressão do gene *gumC* (XF2369) em *Xf* foi suprimida significativamente em meio PW sob condições de alta densidade celular ($p < 0,04$),

enquanto que a expressão de *gumD* (XF2367) e *gumJ* (XF2362) foi detectada somente em condições de alta densidade celular, provavelmente devido a sua baixa abundância em condições de baixa densidade celular, já que a expressão foi detectada por RT-PCR. Esses dados sugerem que a atividade de síntese de intermediários da goma fastidiana em Xf ocorre predominantemente em condições de alta densidade celular, e que o grau de polimerização de goma fastidiana pode ser afetado pela densidade da cultura.

Em várias bactérias gram-negativas, genes homólogos a *luxR* de *Vibrio fischeri* estão envolvidos na percepção de quorum (Fuqua et al., 1994; 1996). Em Xf, foram identificados dois ORFs com a assinatura da família de proteínas LuxR de reguladores transcricionais: *luxR/UHPA* (XF2608) e *pluxR* (XF0972) (Lambais et al., 2000). A expressão do gene *luxR/UHPA* não foi detectada pela análise de “Northern blot” reverso, mas foi detectada por RT-PCR, sugerindo que seu nível de expressão está abaixo dos limites de detecção da metodologia utilizada. Os resultados obtidos no RT-PCR sugerem que sua expressão não é afetada pela densidade da população de Xf em PW. A expressão de *pluxR* também não foi afetada pela densidade da cultura. Esses resultados sugerem que, se Xf possui algum mecanismo de percepção de quorum, este não é homólogo ao sistema LuxR/LuxI, presente em outras bactérias gram-negativas. Como Xf não sintetiza lactonas de homoserina aciladas (Silva & Lambais, 2001), e as proteínas codificadas por *luxR/UHPA* e *pluxR* estão envolvidos na percepção dessas moléculas, é provável que não ocorra alteração da expressão desses genes em meio de cultura. Seria interessante determinar se existe alteração na expressão desses genes em Xf crescendo *in planta*. A expressão induzida desses genes *in planta* poderia indicar uma possível percepção de lactonas de homoserina aciladas sintetizadas por outras bactérias habitantes do xilema.

Os genes *rpfA*, *rpfB*, *rpfC* e *rpfF* codificam fatores que regulam a patogenicidade em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), atuando no controle da síntese de enzimas extracelulares e exopolissacarídeos (EPS) (Lambais et al., 2000; Simpson et al., 2000). Em Xcc, *rpfA* codifica a isoforma mais abundante de aconitase, a qual poderia estar envolvida na homeostase de ferro (Wilson et al., 1998). Já os genes *rpfB* e *rpfF* estão envolvidos na síntese de uma molécula sinal difusível de baixa massa molecular (DSF), que pode estar envolvida na comunicação entre as bactérias durante a percepção de quorum (Barber et al., 1997). Em Xcc, *rpfC* codifica

uma proteína regulatória de um sistema de dois componentes, provavelmente envolvida na percepção da molécula sinal DSF, ativação de genes de patogenicidade e regulação negativa de síntese de DSF (Tang et al., 1991; 1996).

A expressão de *rpfA* foi detectada apenas em condições de alta densidade celular, enquanto a expressão de *rpfB* só foi detectada sob condições de baixa densidade celular. A expressão de *rpfC* não foi detectada nas duas condições estudadas, através de “Northern blot” reverso. No entanto, os transcritos não detectados por “Northern blot” reverso foram detectados por RT-PCR, sugerindo que seus níveis de expressão são baixos. No caso do gene *rpfF*, sua expressão foi induzida significativamente sob condições de alta densidade celular ($p < 0,06$).

Diferente de Xcc, em Xf *rpfB* e *rpfF* estão em operons diferentes, podendo não apresentar co-regulação (Silva et al., 2001). Isto pode explicar o fato de observar-se indução sob condições de alta densidade celular somente para o gene *rpfF*.

RpfF é chave na síntese de DSF, sendo que mutantes *rpfF*⁻ não sintetizam DSF e respondem à adição de DSF ao meio. Já RpfB pode ter outra função na célula, além de estar envolvido na síntese de DSF. Dessa forma, a molécula DSF pode estar sendo sintetizada por Xf no meio PW, sendo sua síntese induzida sob condições de alta densidade celular.

A indução de *rpfA* em condições de alta densidade celular pode estar associada à participação da aconitase codificada no ciclo do ácido cítrico. Alternativamente, o produto de *rpfA* poderia contribuir para o aumento da disponibilidade de ferro intracelular sob condições de alta densidade celular, já que o produto de *rpfA* de Xcc tem capacidade de se ligar ao ferro e pode estar envolvido na homeostase do mesmo.

Os genes codificando celulase (endo- β -1,4-glicanase) (XF0818), poligalacturonase (precursor de pectinase) (XF2466), protease-serina (XF1851) e protease-RE (XF1823) encontrados no genoma de Xf, estão provavelmente envolvidos na degradação da parede celular vegetal e de proteínas extracelulares. No ensaio de “Northern blot” reverso, a expressão do gene de poligalacturonase não foi detectada, provavelmente, devido a sua baixa abundância, já que foi detectada no ensaio de RT-PCR. Os genes de celulase e protease-RE não tiveram a expressão afetada

significativamente pela densidade celular, enquanto a expressão de protease-serina foi suprimida significativamente sob condições de alta densidade celular ($p < 0,04$).

O gene *mdoH* regula a biossíntese de glicanas periplasmáticas relacionadas à patogenicidade em *Pseudomonas syringae* (Loubens et al., 1993). Xf possui um gene homólogo ao gene *mdoH* de *E. coli* (Simpson et al., 2000). Não foram detectadas diferenças significativas de expressão do gene *mdoH* (XF1623), em função da densidade celular.

O produto do gene *fur* em várias bactérias está envolvido no processo de homeostase do ferro, elemento importante para a sobrevivência das bactérias no ambiente. Normalmente sua expressão é induzida em condições de deficiência de ferro. Sob nossas condições experimentais, sua expressão foi suprimida significativamente sob condições de alta densidade celular ($p < 0,02$). Esses dados estão de acordo com os dados de expressão e possível função de *rpfA*. Se RpfA (aconitase) contribui para o aumento da disponibilidade de ferro em alta densidade celular, é esperado que a expressão de *fur* seja realmente suprimida nessas condições.

O gene *rpoN* codifica o fator sigma 54, essencial para a ativação da RNA polimerase e transcrição de genes específicos em condições de estresse (e.g. falta de nitrogênio no meio), ou em interações com patógenos, como no caso da interação *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* - *Nicotiana tabacum* (Fellay et al., 1991). Xf possui um gene com homologia de 64% com o gene *rpoN* de *Xanthomonas campestris*, sugerindo que a transcrição de alguns genes importantes para patogenicidade pode ser regulada por esse fator sigma alternativo. Em nosso experimento, não foram detectadas diferenças significativas de expressão de *rpoN* (XF1408) em função da densidade celular.

Os genes *rsmA* e *rsmB*, controlam a produção de enzimas extracelulares, antibióticos, pigmentos, polissacarídeos, e também os níveis das lactonas de homoserina aciladas (envolvidas no mecanismo de percepção de quorum) em várias espécies de *Erwinia* (Cui et al., 1999). O gene *rsmA* codifica uma proteína que se liga a RNAs e promove sua degradação, enquanto *rsmB* codifica um RNA regulatório que neutraliza a ação de RsmA, formando um complexo ribonucleoproteico inativo (Liu et al., 1998).

Em Xf, observa-se a presença de homólogos de *rsmA* (XF0125) e seu RNA cognato, *rsmB* (XF0928), sugerindo que Xf pode também regular a expressão de genes ao nível de pós-transcrição (Keen et al., 2000). A expressão de *rsmA* foi suprimida significativamente sob condições de alta densidade celular ($p < 0,01$), enquanto a expressão de *rsmB* não foi detectada por análise de “Northern blot” reverso. Já no RT-PCR, detectou-se a expressão de *rsmB*, sendo os sinais mais fortes nas amostras de alta densidade celular.

Sendo RsmA um regulador negativo, a supressão de sua síntese em Xf sob condições de alta densidade celular levaria a um aumento da síntese dos compostos regulados por esse fator. Considerando que *rsmB* tenha expressão induzida em Xf sob condições de alta densidade celular (dados do RT-PCR), esse RNA regulatório atuaria auxiliando na diminuição da atividade de RsmA. Existem evidências de que em *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, os níveis e a atividade de RsmA são rigorosamente controlados pela bactéria para prevenir o declínio de transcritos de genes com funções essenciais (Cui et al., 1999). O perfil de expressão gênica apresentado por Xf sob condições de alta densidade celular, sugere que Xf possui comportamento semelhante ao de *Erwinia*.

Os genes *xpsK* e *xpsL* estão relacionados à secreção ou exportação de proteínas em Xcc (Dums et al., 1991), integrando um sistema de secreção dependente de sinal, composto de um agrupamento de 11 genes: *xpsEFGHIJKLMND* (Dums et al., 1991). A mesma organização celular encontrada em Xcc ocorre em Xf, e a maioria dos produtos dos genes possui alta similaridade na sequência de aminoácidos (Dow & Daniels, 2000). No experimento de “Northern blot” reverso, a expressão de *xpsK* (XF1523) e *xpsL* (XF1524) não foi afetada significativamente em função da densidade celular, sugerindo que esse sistema de secreção não é dependente de densidade celular.

As diferenças nos resultados obtidos com as duas técnicas utilizadas, RT-PCR e “Northern blot” reverso, podem ocorrer devido ao fato da maioria dos genes analisados apresentar níveis muito baixos de expressão. O nível de sensibilidade das técnicas utilizadas pode não ter sido suficiente para detectar cDNAs codificando genes com baixos níveis de expressão, podendo acarretar, por exemplo, na não-detecção da expressão de alguns genes no ensaio de “Northern blot” reverso.

É importante ressaltar que o padrão de expressão gênica observado pode ser alterado em função do meio de cultivo. Da mesma forma, Xf crescendo no interior dos vasos de xilema pode apresentar padrões de expressão gênica diferentes dos observados em meio PW.

Um aspecto muito importante a ser considerado é a porcentagem de células viáveis em cada ponto de coleta, já que aos 4 dias de cultivo (ponto de coleta representando baixa densidade celular) a viabilidade celular era de aproximadamente 100%, enquanto aos 12 dias (ponto de coleta de alta densidade celular) a viabilidade celular diminuiu para aproximadamente 45%. Como discutido anteriormente, alterações na viabilidade das células bacterianas podem alterar totalmente o padrão de expressão gênica.

Uma análise de “microarrays” permitiria uma análise mais completa e detalhada dos agrupamentos de genes de interesse (*gum*, *rpf*, *xps*, entre outros), e forneceria informações sobre alterações da fisiologia de Xf em função da densidade celular.

5 CONCLUSÕES

Pode-se afirmar que sob as condições experimentais utilizadas:

- Os genes *fur* (XF-2344), *gumC* (XF-2369), protease-serina (XF-1851) e *rsmA* (XF-0125) tiveram sua expressão significativamente suprimida sob condições de alta densidade celular ($p < 0,05$).
- A expressão de *rpfF* (XF-1115) foi induzida significativamente ($p < 0,06$) sob condições de alta densidade celular.
- Os genes *gumD* (XF-2367), *gumJ* (XF-2362) e *rpfA* (XF-0290) tiveram a expressão detectada somente sob condições de alta densidade celular, enquanto a expressão de *rpfB* (XF-0287) foi detectada somente sob condições de baixa densidade celular.
- A expressão de celulase (endo- β -1,4-glicanase) (XF0818), *mdoH* (XF-1623), *pluxR* (XF-0972), *protease-RE* (XF-1823), *rpoN* (XF-1408), *xpsK* (XF-1523) e *xpsL* (XF-1524) não foi afetada significativamente pela densidade populacional em meio PW.
- Os genes *luxR/UHPA* (XF-2608), poligalacturonase (precursor de pectinase) (XF-2466), *rpfC* (XF-1114) e *rsmB* (XF-0928) não apresentaram expressão em culturas de Xf sob condições de baixa e alta densidade celular em meio PW.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p.

ALMEIDA, R.P.P.; PEREIRA, E.F.; PURCELL, A.H. et al. Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange. **Plant Disease**, v.85, n.4, p.382-286, 2001.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York : Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, 1992. v.1.

AUTY, M.A.E.; GARDINER, G.E.; McBREARTY, S.J. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.1, p.420-425, 2001.

BARBER, C.E.; TANG, J.L.; FENG, J.X. et al. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 24, n.3, p.555-566, 1997.

BARRAS, F.; VAN GIJSENGEM, F.; CHATTERJEE, A.K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.231-234, 1994.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Pathology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

- BUNTHOF, C.J.; VAN SCHALKWIJK, S.; MEIJER, W. et al. Fluorescent method for monitoring cheese starter permeabilization and lysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.9, p.4264-4271, 2001.
- CAMARGO, L.E.A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.24, p.470-493.
- CARVALHO, M.L.V. Situação atual da clorose variegada dos citros e estratégias de controle. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, p.328, 1996, Suplemento.
- CARVALHO, M.L.V.; ROSSETI, V.; POMPEU JUNIOR, J. Evolução da sintomatologia de clorose variegada dos citros em laranja doce (*C. sinensis*). **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.351, 1995, Suplemento.
- CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y. et al. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.11, n.11, p.1119-1129, 1998.
- CHANG, C.J.; WALKER, J.T. Bacterial leaf scorch of northern red oak - isolation, cultivation, and pathogenicity of a xylem-limited bacterium. **Plant Disease**, v.72, n.8, p.730-733, 1988.
- CHOY, H.E.; PARK, S.W.; AKI, T. et al. Repression and activation of transcription by gal and lac repressors - involvement of alpha subunit of RNA-polymerase. **EMBO Journal**, v.14, n.18, p.4523-4529, 1995.
- CUBO, M.T.; ECONOMOU, A.; MURPHY, G. et al. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABCR* that can influence nodulation of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.12, p.4026-4035, 1992.

- CUI, Y.; CHATTERJEE, A.; LIU, Y. et al. Identification of a global repressor gene, *rsmA*, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* that controls extracellular enzymes, N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone, and pathogenicity in soft-rooting *Erwinia* spp. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.17, p.5108-5115, 1995.
- CUI, Y.; MUKHERJEE, A.; DUMENYO, C.K. et al. *rsmC* of the soft-rooting bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* negatively controls extracellular enzyme and hairpin_{ECC} production and virulence by modulating levels of regulatory RNA (*rsmB*) and RNA-binding protein (RsmA). **Journal of Bacteriology**, v.181, n.19, p.6042-6052, 1999.
- DAVIS, M.J.; FRENCH, W.J.; SCHAAD, N.W. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. **Current Microbiology**, v.6, n.4, p.309-314, 1981.
- DE KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. **Infection and Immunity**, v.68, n.9, p.4839-4849, 2000.
- DE NEGRI, J.D.; GARCIA JUNIOR, A. Sugestões para o manejo de pomares com clorose variegada de citros. **Laranja**, v.14, n.1, p.255-267, 1993.
- DE SAIZIEU, A.; CERTA, U.; WARRINGTON, J. et al. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. **Nature Biotechnology**, v.16, n. 1, p.45-48, 1998.
- DEBARBIEUX, L.; BOHIN, A.; BOHIN, J.P. Topological analysis of the membrane-bound glucosyltransferase, MdoH, required for osmoregulated periplasmic glucan synthesis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.21, p.6692-6698, 1997.
- DECKER, E.-M. The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, n.3, p.188-192, 2001.

- DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.339-367, 1990.
- DONADIO, L.C.; MOREIRA, C.S. **Clorose variegada dos citros**. Bebedouro: Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro, 1997. 162p. Edição Comemorativa do 15º Aniversário.
- DOW, J.M.; DANIELS, M.J. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. **Yeast**, v.17, n.4, p.263-271, 2000.
- DOW, J.M.; DANIELS, M.J.; DUMS, F. et al. Genetic and biochemical analysis of protein export from *Xanthomonas campestris*. **Journal of Cell Science**, v.11, p.59-72, 1989, Suplemento.
- DOW, J.M.; FENG, J.X.; BARBER, C.E. et al. Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. **Microbiology**, v.146, n.4, p.885-891, 2000.
- DOW, J.M.; SCOFIELD, G.; TRAFFORD, K. et al. A gene-cluster in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* required for pathogenicity controls the excretion of polygalacturonate lyase and other enzymes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.31, n.2, p.261-271, 1987.
- DUMS, F.; DOW, J.M.; DANIELS, M.J. Structural characterization of protein secretion genes of the bacterial phytopathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*: relatedness to secretion systems of other gram-negative bacteria. **Molecular General Genetics**, v.229, n.3, p. 357-364, 1991.
- EBERHARD, A. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. **Journal of Bacteriology**, v.109, n.3, p.1101-1105, 1972.

- EBERHARD, A.; BURLINGAME, A.L.; EDERHARD, C. et al. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri*. **Biochemistry**, v.20, n.9, p.2444-2449, 1981.
- EBERHARD, A.; LONGIN, T.; WIDRIG, C.A. et al. Synthesis of the *lux* gene autoinducer in *Vibrio fischeri* is positively autoregulated. **Archives of Microbiology**, v.155, n.3, p.294-297, 1991.
- FELLAY, R. et al. Genes and signals controlling the *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*-plant interaction. In: Hennecke, H.; Verma, D.P.S. **Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 45-52.
- FRENCH, W.I.; STASSI, D.L. Response of phony-infected peach trees with gibberelic acid. **HortScience**, v.13, n.2, p.158-159, 1978.
- FRY, S.M.; HUANG, J.S.; MILHOLLAND, R.D. Isolation and preliminary characterization of extracellular proteases produced by strains of *Xylella fastidiosa* from grapevines. **Biochemistry and Cell Biology**, v.84, n.4, p.357-363, 1994.
- FRY, S.M.; MILHOLLAND, R.D. Response of resistant, tolerant, and susceptible grapevine tissues to invasion by the Pierce's disease bacterium, *Xylella fastidiosa*. **Phytopathology**, v.80, n.1, p.66-69, 1990.
- FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA (FUNDECITRUS). **Clorose variegada dos citros (CVC)**. <http://www.fundecitrus.com.br>. (03/08/2001).
- FUQUA, C.; BURBEA, M.; WINANS, S.C. Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.5, p.1367-1373, 1995.

- FUQUA, C.; WINANS, S.C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.10, p.2796-2806, 1994.
- FUQUA, C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Census and consensus in bacterial ecosystems: the Lux-R-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.727-751, 1996.
- FUQUA, C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v.176, n.2, p.269-275, 1994.
- GOPALAN, S.; HE, S.Y. Bacterial genes involved in the elicitation of hypersensitive response and pathogenesis. **Plant Disease**, v.80, n.6, p.604-610, 1996.
- HANTKE, K. Negative control of iron uptake systems in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.15, n.2, p.83-86, 1982.
- HANTKE, K. Regulation of ferric ion transport in *E. coli*: isolation of a constitutive mutant. **Molecular General Genetics**, v.182, n.2, p. 288-292, 1981.
- HARRINGTON, C.A.; ROSENOW, C.; RETIEF, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, n.3, p.285-291, 2000.
- HAYWARD, A.C.; MARIANO, R.L.R. Mecanismos de virulência e patogenicidade de procariotos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.5, p.199-234, 1997.
- HE, S.Y. Tipe III secretion systems in plant and animal pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.363-392, 1998.

- HENDRICKSON, E.L.; GUEVERA, P.; AUSUBEL, F.M. The alternative sigma factor RpoN is required for *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription. **Journal of Bacteriology**, v.182, n.12, p.3508-3516, 2000.
- HOPKINS, D.L. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.27, p.271-290, 1989.
- HORNS, T.; BONAS, U. The *rpoN* gene of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is not required for pathogenicity. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.9, n.9, p.856-859, 1996.
- ISHIHAMA, A. Adaptation of gene expression in stationary phase. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.7, n.5, p.582-588, 1997.
- JONES, S.; YU, B.; BAINTON, N.J. et al. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. **EMBO Journal**, v.12, n.6, p. 2477-2482, 1993.
- KATZEN, F.; FERREIRO, D.U.; ODDO, C.G.; et al. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris gum* mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.7, p. 1607-1617, 1998.
- KEEN, N.T.; DUMENYO, C.K.; YANG, C.H. et al. From rags to riches: insights from the first genomic sequence of a plant pathogenic bacterium. **Genome Biology**, v.1, n.3, p.1019.1-1019.4, 2000.
- KIRALY, Z.; EL ZAHABY, H.M.; KLEMENT, Z. Role of extracellular polysaccharide (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. **Journal of Phytopathology**, v.145, n.2-3, p.59-68, 1997.

- KJELLEBERG, S.; HERMANSSON, M.; MARDEN, P. et al. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. **Annual Review of Microbiology**, v.41, p.25-49, 1987.
- KOLTER, R.; SIEGELE, D.A.; TORMO, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. **Annual Review of Microbiology**, v.47, p.855-874, 1993.
- LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, v.56, n.2, p.215-224, 1989.
- LAMBAIS, M.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J.O. **Avanços em fundamentos e aplicações de micorrizas**. Lavras: UFLA, 1996. cap.2, p.5-38.
- LAMBAIS, M.R. Biologia molecular e engenharia genética na fitopatologia. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.26, p.507-538.
- LAMBAIS, M.R.; GOLDMAN, M.H.S.; CAMARGO, L.E.A. et al. A genomic approach to the understanding of *Xylella fastidiosa* pathogenicity. **Current Opinion in Microbiology**, v.3, n.5, p. 459-462, 2000.
- LEE, H.M.; TYAN, S.W.; LEU, W.M. et al. Involvement of XpsN protein in formation of the XpsL-XpsM complex in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* type II secretion apparatus. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.2, p.528-535, 2001.
- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.; DERRICK, K. Clorose variegada dos citros: uma nova e destrutiva doença dos citros no Brasil. **Laranja**, v.12, n.2, p.345-356, 1991.

- LEE, R.F.; BERETTA, M.J.G.; HARTUNG, J.H. et al. Citrus variegated chlorosis: confirmation of a *Xylella fastidiosa* as the causal agent. **Summa Phytopathologica**, v.19, n.2, p.123-125, 1993.
- LEE, R.F.; RAJU, B.C.; NYLAND, G. et al. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. **Phytopathology**, v.72, n.7, p.886-888, 1982.
- LEITE JUNIOR, R.P. Escaldadura da folha em ameixeira: a doença e seu agente causal *Xylella fastidiosa*. **Fitopatologia Brasileira**, n.21, p.327, 1996, Suplemento.
- LEITE, B.; PASCHOLATI, S.F.; KITAJIMA, E.W. et al. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.9, p.1-41, 2001.
- LI, W.B.; ZREIK, L.; FERNANDES, N.G. A triply cloned strain of *Xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. **Current Microbiology**, v.39, n.2, p.106-108, 1999.
- LILLEY, B.N.; BASSLER, B.L. Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and Sigma-54. **Molecular Microbiology**, v.36, n.4, p.940-954, 2000.
- LIU, Y.; CUI, Y.; MUKHERJEE, A. et al. Characterization of a novel RNA regulator of *Erwinia carotovora* spp. *carotovora* that controls production of extracellular enzymes and secondary metabolites. **Molecular Microbiology**, v.29, n.1, p.219-234, 1998.
- LOCKHART, D.J.; WINZELER, E.A. Genomics, gene expression and DNA arrays. **Nature**, v.405, n.6788, p.827-836, 2000.
- LOPES, J.R.S. Mecanismos de transmissão de *Xylella fastidiosa* por cigarrinhas. **Fitopatologia Brasileira**, n.21, p.328, 1996, Suplemento.

- LOUBENS I.; DEBARBIEUX, L.; BOHIN, A. et al. Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Microbiology**, v.10, n.2, p.329-340, 1993.
- LUCAS, J.A. **Plant pathology and plant pathogens**. 3.ed. Oxford:The Blackwell Science, 1998. cap.9, p.140-165.
- MA, W.L.; CUI, Y.; LIU, Y. et al. Molecular characterization of global regulatory RNA species that control pathogenicity factors in *Erwinia amylovora* and *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.6, p.1870-1880, 2001.
- MARTIN, K.J.; PARDEE, A.B. Identifying expressed genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.8, p.3789-3791, 2000.
- MEHDY, M.C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, v.105, n.2, p.467-472, 1994.
- MIZUBUTI, E.S.G.; MATSUOKA, K.; ARIZZI, P. Associação de bactérias do tipo *Xylella* em laranjeiras com sintomas de clorose variegada na região da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, n.12, p.241-242, 1994.
- MORÉ, M.I.; FINGER, L.D.; STRYKER, J.L. et al. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. **Science**, v.272, n.5268, p.1655-1658, 1996.
- MUKHERJEE, A.; CUI, Y.; LIU, Y. et al. Global regulation in *Erwinia* species by *Erwinia carotovora* *rsmA*, a homologue of *Escherichia coli* *csrA*: repression of secondary metabolites, pathogenicity and hypersensitive reaction. **Microbiology**, v.142, n.2, p.427-434, 1996.

- NORMAN-SETTERBLAD, C.; VIDAL, S.; PALVA, E.T. Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degradating enzymes from *Erwinia carotovora*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.13, n.4, p.430-438, 2000.
- NYSTRÖM, T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. **Archives of Microbiology**, v.176, n.3, p.159-164, 2001.
- PARADELA FILHO, O.; SUGIMORI, M.H.; RIBEIRO, I.J.A. et al. Primeira constatação em cafeeiro no Brasil de *Xylella fastidiosa* causadora da clorose variegada dos citros. **Laranja**, v.16, n.2, p.135-136, 1995.
- PARSEK, M.R.; GREENBERG, P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.16, p.8789-8793, 2000.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.22, p.417-453.
- PIERSON III, L.S.; WOOD, D.W.; CHANCEY, S.T. Phenazine antibiotic biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated at multiple levels. In: STACEY, G.; MULLIN, B.; GRESSHOFF, P.M. **Biology of Plant-Microbe Interactions**. St. Paul: International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, 1996. p. 463-468.
- PIERSON III, L.S.; WOOD, D.W.; PIERSON, E.A. Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.207-225, 1998.

- PIERSON, E.A.; WOOD, D.W.; CANNON, J.A. et al. Interpopulation signaling via *N*-acyl-homoserine lactones among bacterial in the wheat rhizosphere. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.11, n.11, p.1078-1084, 1998.
- PIRHONNEN, M.; FLEGO, D.; HEIKIHEIMO, R. et al. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. **EMBO Journal**, v.12, n.6, p.2467-2476, 1993.
- POOLER, M.R. & HARTUNG, J.S. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. **Current Microbiology**, v.31, n.6, p.377-381, 1995.
- PUGSLEY, A.P.; D'ENFERT, C.; REYSS, I. et al. Genetics of extracellular protein secretion by gram-negative bacteria. **Annual Review of Genetics**, v.24, p.67-90, 1990.
- PURCELL, A.H.; HOPKINS, D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.34, p.131-151, 1996.
- RATLEDGE, C.; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.881-941, 2000.
- ROBERTO, S.R.; COUTINHO, A.; LIMA, J.E.O. et al. Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.4, p.517-518, 1996.
- ROMANTSCHUK, M.; ROINE, E.; TAIRA, S. Hrp pilus – reaching through the plant wall. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.2, p.153-160, 2001.
- ROMEO, T. Global regulation by the small RNA-binding protein CrsA and the non-coding RNA molecule CrsB. **Molecular Microbiology**, v.29, n.6, p.1321-1330, 1998.

- ROSSETTI, V.; DE NEGRI, J.D. Clorose variegada dos citros - Revisão. **Laranja**, v.11, n.1, p.1-14, 1990.
- RUBY, E.G. Lessons from a cooperative bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ. **Annual Review of Microbiology**, v.50, p.591-624, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- SCHRIPSEMA, J.; DE RUDDER, K.E.E.; VAN VLIET, T.B. et al. Bacteriocin *small* of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of *N*-acyl-L-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors. **Journal of Bacteriology**, v.178, n.2, p. 366-371, 1996.
- SILVA, D.S.; LAMBAIS, M.R. Expressão de fatores de virulência e/ou patogenicidade putativos em *Xylella fastidiosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., Foz do Iguaçu, 2001. **Resumos**. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001, p.206.
- SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L. et al. Fastidian gum: *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology**, v. 203, n.2, p.165-171, 2001.
- SIMPSON, A.J.G.; REINACH, F.C; ARRUDA, P. et al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, v.406, n.6792, p.151-157, 2000.
- SLATER, H.; ALVAREZ-MORALES, A.; BARBER, C.E. et al. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. **Molecular Microbiology**, v.38, n.5, p.986-1003, 2000.

- TANG, J.L.; FENG, J.X.; LI, Q.Q. et al. Cloning and characterization of the *rpfC* gene of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: involvement in exopolysaccharide production and virulence to rice. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.9, n.7, p.664-666, 1996.
- TANG, J.L.; LIU, Y.N.; BARBER, C.E. et al. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* patovar *campestris*. **Molecular General Genetics**, v.226, n.3, p. 409-417, 1991.
- TAO, H.; BAUSCH, C.; RICHMOND, C. et al. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.20, p.6425-6440, 1999.
- TURNER, K.; PORTER, J.; PICKUP, R. et al. Changes in viability and macromolecular content of long-term batch cultures of *Salmonella typhimurium* measured by flow cytometry. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, n.1, p.90-99, 2000.
- VASIL, M.L.; OCHSNER, U.A. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. **Molecular Microbiology**, v.34, n.3, p.399-413, 1999.
- VOJNOV, A.A.; SLATER, H.; DANIELS, M.J. et al. Expression of the *gum* operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.14, n.6, p.768-774, 2001.
- WANG, J.C.; YAO, L.B.; ZHAO, Z.L. The progress of the methods for screening differentially expressed genes and proteins. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, v.28, n.1, p.33-36, 2001.
- WELLS, J.M.; RAJU, B.C.; HUNG, H.Y. et al. *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.37, n.2, p. 136-143, 1987.

WILSON, T.J.G.; BERTRAND, N.; TANG, J.L. et al. The *rpfA* gene of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*, which is involved in the regulation of pathogenicity factor production, encodes an aconitase. **Molecular Microbiology**, v.28, n.5, p.961-970, 1998.