UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

FLÁVIA MARIA DE SOUZA CARVALHO

EXPRESSÃO GÊNICA EM *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
CONTROLADA POR PROMOTORES INDUZIDOS PELA PLANTA
HOSPEDEIRA

RIBEIRÃO PRETO

Junho - 2006

FLÁVIA MARIA DE SOUZA CARVALHO

**EXPRESSÃO GÊNICA EM *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* CONTROLADA
POR PROMOTORES INDUZIDOS PELA PLANTA HOSPEDEIRA**

Orientador: Dr. Jesus Aparecido Ferro

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
como requisito à obtenção do título de doutor
em Ciências, área de concentração em
Genética.

RIBEIRÃO PRETO

Estado de São Paulo - Brasil

Junho – 2006

Carvalho, Flávia Maria de Souza

Expressão gênica em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
controlada por promotores induzidos pela planta hospedeira.

Ribeirão Preto, 2006.

177p.: il.; 30cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto - FMRP/USP – Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro.

1. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 2. Cancro Cítrico 3. Expressão
Gênica Diferencial 4. Patogenicidade

O Menestrel

Você aprende...

*Depois de algum tempo você aprende a diferença,
A sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma Alma.*

E você aprende que amar não significa apoiar-se,

E que companhia nem sempre significa segurança,

E começa a aprender que beijos não são contratos e que presentes não são promessas,

E começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida, e os olhos adiante,

Com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

E aprende a construir todas as suas estradas no hoje,

Porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos,

E o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.

E aprende que não importa o quanto você se importe,

Algumas pessoas simplesmente não se importam...

E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa,

Ela vai ferí-lo de vez em quando, e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.

Descobre que se leva anos prá se construir confiança,

E apenas segundos para destruí-la...

E que você pode fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias,

E o que importa não é O Que você tem na vida, mas Quem você tem na vida,

E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos que mudar de amigos, se compreendemos que os amigos mudam.

Percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada,

E terem bons momentos juntos.

*Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida,
São tomadas de você muito depressa...
Por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas;
Pode ser a última vez que as vejamos.
Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós,
Mas nós somos responsáveis por nós mesmos.
Começa a aprender que não se deve comparar com os outros,
Mas com o melhor que pode ser.
Descobre que se leva muito tempo prá se tornar a pessoa que quer ser,
E que o tempo é curto...
Aprende que não importa onde já chegou, mas aonde está indo...
Mas, se você não sabe onde está indo, qualquer caminho serve.
Aprende que, ou você controla seus atos, ou eles o controlarão...
E que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade,
Pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.
Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer,
Enfrentando as conseqüências.
Aprende que paciência requer muita prática.
Descobre que algumas vezes, a pessoa que você espera que o chute quando você cai,
É uma das poucas que o ajudam a levantar-se.
Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiências que se teve,
E o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou.
Aprende que há mais de seus pais em você do que você supunha.
Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens...
Poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.
Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva,
Mas isso não dá a você o direito de ser cruel.*

*Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame,
Não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode,
Pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como desmostrar ou viver isso.
Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém...
Algumas vezes você tem de aprender a perdoar-se a si mesmo.
Aprende que com a mesma severidade com que julga,
Você será em algum momento condenado.
Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido,
O mundo não pára para que você o concerte.
Aprende que o tempo não é algo que possa voltar.
Portanto, plante seu jardim e decore sua Alma,
Em vez de esperar que alguém lhe traga flores.
E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte,
E que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais.
E que realmente a vida tem valor, e que você tem valor diante da vida!
Nossas dúvidas são traidoras,
E nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar,
Se não fosse o medo de tentar.*

William Shakespeare

*Ao meu marido Reginaldo pelo companheirismo e pelo incessante apoio e
compreensão,*

com amor

DEDICO

À minha mãe Catharina de Souza,

Aos meus irmãos Antônio Carlos e Vanderlei,

com carinho

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, soberanamente Bom e Justo, pela oportunidade de existência neste plano terreno;

Ao Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro, pela orientação, apoio, incentivo e valiosas sugestões;

Ao Dr. Julio Cezar Franco de Oliveira, pela co-orientação, ensinamentos e pela constante presença no desenvolvimento deste trabalho;

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pelos incentivos, pela amizade, pelo saudável convívio e pela disponibilização do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Tecnologia da FCAV/Unesp/Jaboticabal;

Aos professores e colegas do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelos ensinamentos e amizade;

Às secretárias amigas, Maria Aparecida e Susie, do Departamento de Genética da FMRP, pela atenção em esclarecer e atender minhas necessidades;

Aos membros da Comissão Examinadora pela disponibilidade em participar da banca visando contribuições para este trabalho;

Aos amigos do C.E.U. (Centro Espírita Universal/Jaboticabal) pelo carinho e amor recebidos lá, local onde encontrei sustentação e equilíbrio Espiritual;

Aos amigos e integrantes do Grupo A.MO.R. (Auxílio aos Moradores de Rua/Jaboticabal) pela oportunidade de trabalho e aprendizagem;

Aos amigos do LBM da FCAV/Unesp/Jaboticabal, Agda, Dani, Gisele, Ju Vantini, Fabiana, Regina, Gustavo, Paula, Fabrício, Julinho, Tiago, Rafael Marini, Vanessa Morgan, Cristiano, Juliana De Antonio, Rafael Heck, Roseli, Nilson, Mariana, Thaís, André “Splinter”, Leonardo “Biela”, e àqueles que já não se encontram mais no LBM, Poliana, Neli, Carminha, Ju Dezajacomo, Joice, Rafael Homem, Vanessa Parpi, Letícia, Lilian, Camila, Roberto Noda, Andressa e Tatiana, pelo coleguismo, amizade, aprendizagens e companheirismo nos momentos de alegria e de dificuldades;

À Karina Maia Dabbas, pela querida presença amiga, que com certeza muito contribuiu nesta minha caminhada existencial;

À Renata Izabel Dozzi Tezza pelo desenvolvimento de uma ferramenta de bioinformática e pelo carinho e amizade;

Ao Marcelo Luiz de Laia, pela acessoria nas análises estatísticas e apoio nos momentos de dificuldades;

À profa. Dra. Maria Cristina Roque Antunes Barreira, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, pela disponibilização do aparelho *Phosphoimager FLA3000-G*, imprescindível para a realização desta Tese;

Ao auxílio financeiro da CAPES pela bolsa de doutorado concedida, e da FAPESP pelos recursos proporcionados dentro do Auxílio Jovem Pesquisador nº 04/02006-7;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram em mais esta importante etapa em minha existência, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Cancrose e o Agente Etiológico.....	3
2.2 Prejuízos Causados pelo Cancro Cítrico.....	7
2.3 As Interações Planta-Patógeno	8
2.4 Genômica de Bactérias Fitopatogênicas	10
2.5 Sistema de Secreção Tipo III	11
2.6 Promotores Bacterianos Induzidos Pela Planta.....	16
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Mapeamento “in silico” dos Genes Contendo Promotores “PIP box”	21
4.2 Seleção dos Clones PIP-Candidatos	23
4.3 Mini Preparação de DNA Plasmidial.....	23
4.4 Reação de Sequenciamento e Análise das Sequências	25
4.5 Confecção das Membranas de Macroarranjo.....	27
4.6 Inoculação de <i>Xac</i> em Folhas de Laranjeira	29
4.7 Cultivo de <i>Xac</i> em Meio Indutivo XAM1 e em Meio Caldo Nutriente	31
4.8 Extração de RNA de <i>Xac</i>	31
4.9 Eletroforese em Gel de Agarose Desnaturante	33
4.10 Síntese das Sondas de cDNA.....	33
4.11 Pré-hibridação e Hibridação das Membranas de Macroarranjo.....	35
4.12 Lavagem das Membranas	36
4.13 Recuperação das Membranas Após as Hibridações	36
4.14 Análise Estatística das Hibridações dos Macroarranjos	37
4.15 Validação das Análises por RT-PCR Semi-quantitativa	38
4.15.1 Tratamento de RNAs com DNase.....	39
4.15.2 RT-PCR Semi-quantitativa	40
4.15.3 “Southern blot”: Marcação de Sonda e Hibridação	41
4.16 Análise de Promotores “PIP box” Através de Ensaio de Gene Repórter.....	43
4.16.1 Construção do Vetor pBGUS	43
4.16.1.1 Eletroporação em Células Competentes de <i>Escherichia coli</i>	44
4.16.1.2 Desenho de Oligonucleotídeos e Construções no pBGUS	46
4.16.2 Construções no Vetor pHM1	49
4.16.3 Ensaio de Atividade de GUS em Células de <i>Xac</i> Transformadas	53
4.16.3.1 Ensaio Enzimático	53
4.16.3.2 Determinação Espectrofotométrica.....	54
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO	56
5.1. Mapeamento “in silico” dos Genes Contendo Promotor “PIP box”	56
5.2 Confecção dos Macroarranjos	63

5.3 Obtenção de RNA de <i>Xac</i> e Síntese das Sondas de cDNAs	64
5.4 Hibridações das Membranas de Náilon com cDNAs Marcados.....	66
5.5. Genes Diferencialmente Expressos	67
5.5.1. Categorização.....	67
5.5.2 Perfil de Expressão ao Longo da Infecção.....	68
5.5.3 Classes Funcionais	77
5.5.3.1 Sistema de Secreção do Tipo III	78
5.5.3.2 Metabolismo de Membrana e Parede Celular	86
5.5.3.3 Sistema de Captação de Ferro.....	91
5.5.3.4 Metabolismo de Açúcares e Degradação da Parede Vegetal.....	95
5.5.3.5 Transdução de Sinais ou Sistema de Dois Componentes	97
5.5.3.6 Flagelo, Biofilme e Adesividade	99
5.5.3.7 Metabolismo de Ácidos Nucléicos	101
5.5.3.8 Transportadores de Membrana	108
5.5.3.9 Metabolismo Energético	112
5.5.3.10 Resposta ao Estresse Ambiental	116
5.5.3.11 Proteínas Putativamente Secretadas.....	118
5.5.3.12 Hipotéticas	120
5.5.3.13 Outros genes diferencialmente expressos	121
5.6 Validação do Macroarranjo Através de RT-PCR Semi-quantitativa.....	128
5.7 Funcionalidade de “PIP box” Através de Gene Repórter	138
5.7.1 Obtenção do Vetor pBGUS e dos Vetores pHMGUS0416, pHMGUS0424 e pHMGUS	138
5.7.2 Análise da Atividade Enzimática de GUS	145
6. CONCLUSÃO	155
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

RESUMO

O cancro cítrico, causado pela bactéria Gram negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) é considerado uma das principais doenças da citricultura nacional e mundial, devido à susceptibilidade do hospedeiro e por não existirem métodos de controle eficientes. Dados da literatura relatam que alguns genes de bactérias fitopatogênicas possuem uma sequência consenso de nucleotídeos (TTCGC...N15...TTCGC) denominada “PIP box” ou “**p**lant-**i**nducible-**p**romoter box”, localizada na região promotora e responsável pela ativação da expressão de fatores de patogenicidade e virulência quando o patógeno entra em contato com a planta hospedeira. O objetivo deste trabalho foi mapear e investigar no genoma da *Xac* a expressão de genes contendo sequências do tipo “PIP box”, a 5’ da ORF ou internamente na região codificadora, através da técnica de macroarranjo. Com auxílio de uma ferramenta de bioinformática (script PERL), 208 sequências consenso para o elemento cis-regulatório “PIP box” foram mapeados no genoma da *Xac*, e clones contendo sequências codificadoras associadas aos promotores do tipo “PIP box” foram recuperados do banco de clones gerado pelo projeto de sequenciamento da bactéria e validados por sequenciamento. Os DNAs plasmidiais representando cada clone foram preparados e imobilizados em membranas de náilon (macroarranjo), as quais foram hibridadas com sondas de cDNAs marcadas com [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP e obtidas a partir de RNA total extraído da bactéria em estágio não infectante (cultivada em meio de cultura Caldo Nutriente – meio CN) e da bactéria infectante (cultivada por 12 horas ou 20 horas em meio XAM1 indutor de patogenicidade e virulência, ou coletada por exsudação 3 dias ou 5 dias após inoculação em folhas de laranjeira). A análise da expressão dos genes contendo promotores “PIP box” putativos revelou 67 genes diferencialmente expressos quando a bactéria teve o seu programa de infecção disparado (indução “in vitro” ou “in vivo”). A validação dos resultados de macroarranjo foi realizada para alguns dos genes por meio de RT-PCR semi-quantitativo e a funcionalidade da sequência “PIP box” para alguns promotores foi demonstrada através do gene repórter GUS. Os genes com expressão diferencial foram classificados segundo a função biológica das respectivas proteínas codificadas e estão envolvidos em processos tão distintos quanto sistema de secreção tipo III, metabolismo de membrana e parede celular, sistema de captação de ferro, metabolismo de açúcares e degradação da parede vegetal, transdução de sinais, metabolismo de flagelo, formação de biofilme e adesividade, metabolismo de ácidos nucléicos, transportadores de membrana, metabolismo energético e resposta a estresse ambiental. O possível papel destas modificações para a interação planta-patógeno e a instalação do cancro cítrico é discutida.

ABSTRACT

The citrus canker, caused by the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri* (*Xac*), is considered worldwide as one of the most important disease of citrus crop due to the lack of resistance in citrus plants and to the absence of efficient methods to control the disease. It was already shown that several genes involved in virulence and pathogenicity in plant pathogenic bacteria have a consensus nucleotide sequence (TTCGC...N15...TTCGC) named **plant-inducible-promoter box** or **PIP box**, located in the promoter region of the genes, which are responsible to activate the expression of genes during the host-bacteria interaction. The aim of this work was to map in *Xac* genome the genes containing the PIP box sequence in the promoter region, or internal to the ORF sequence, and analyze their expression during plant infection using the macroarray technique. Using a PERL script, 208 PIP box consensus sequence associated to genes were found in the *Xac* genome and clones containing all these genes and their PIP box sequences were recovered from a *Xac* genome clone bank and reconfirmed by sequencing. The plasmidial DNA containing the gene and the PIP box from each clone were purified, immobilized onto a nylon membrane (macroarray) and hybridized with [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP-labeled cDNAs synthesized from *Xac* total RNA isolated from bacteria in non-infecting (grown in NB nutrient medium) and infecting (grown for 12 or 20 hours in XAM1 medium that mimics the environment of the plant intercellular space (“in vitro”) or for 3 or 5 days in orange plant leaves (“in vivo”) conditions. The gene expression profile resulting from the array analysis revealed that 67 genes were differentially expressed during the temporal course of the infection. The results were validated through the analysis of expression profile for some genes using semi-quantitative RT-PCR and the PIP box functionality for some promoters was demonstrated using GUS as reporter gene. The differentially expressed genes were classified regarding the biological function of the encoded protein and related to several relevant processes as type III secretion system, membrane and cellular wall metabolism, iron uptake, sugar metabolism and host cell wall degradation, signal transduction, flagellum metabolism, biofilm formation and adhesiveness, nucleic acid metabolism, membrane transporters, energetic metabolism and stress response. The possible roles of these modifications for the bacteria-plant interaction and disease installation are discussed.

1. INTRODUÇÃO

O cancro cítrico, causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), é considerado em todo mundo como a mais agressiva doença dentre aquelas que acometem plantas cítricas de importância comercial tais como, laranjas, limões, limas e pomelos, levando a perdas significativas na citricultura nacional e mundial. Embora os principais sintomas do cancro sejam observados nas folhas e nos frutos, todos os órgãos aéreos da planta podem ser afetados. Os sintomas envolvem a formação de lesões corticosas e salientes em ambos os lados da folha, que se manifestam de uma semana a dois meses após a inoculação, dependendo das condições ambientais, podendo também se desenvolver nos frutos e caules infectados (Koller *et al.*, 1993). As *Xanthomonas* spp. não possuem um mecanismo ativo de penetração através da parede celular vegetal; desta forma, suas “portas de entrada” são constituídas pelas aberturas naturais da planta, os estômatos e hidatódios, bem como regiões submetidas a ferimentos mecânicos (Brown, 2001).

Bactérias fitopatogênicas Gram-negativas, incluindo a *Xac*, possuem sofisticadas estratégias para colonizar plantas hospedeiras, como por exemplo, o sistema de secreção tipo III (SSTT), que possibilita a secreção de proteínas de patogenicidade e virulência (efetoras) da bactéria diretamente no citoplasma da célula vegetal atacada. A expressão de genes que codificam proteínas estruturais do SSTT e de genes que codificam proteínas efetoras secretadas por ele são mediadas, em parte, pelas proteínas codificadas pelos genes *hrpX* e *hrpG*, ambos encontrados em *Xac*. Genes e operons do SSTT possuem uma sequência consenso de nucleotídeos (TTCGC...N15...TTCGC), localizada na região promotora, que tem sido caracterizada como elemento que induz a expressão gênica na presença da planta ou “PIP box” (**P**lant-**I**nducible-**P**romoter box)

(Fenselau & Bonas, 1995; Wengelnik & Bonas, 1996). Esses genes são regulados de maneira dependente à proteína HrpX, que se liga na sequência do “PIP box” e ativa a transcrição dos mesmos (Da Silva *et al.*, 2002; Whalen *et al.*, 1993).

Sequências do tipo “PIP box” também foram encontradas em regiões promotoras dos operons *hrpC*, *hrpD* e *hrpF* de *X. campestris pv. vesicatoria* (Xcv), sugerindo que esses consensos devam ter uma importante função no controle da transcrição dos genes que fazem parte dos referidos operons (Fenselau & Bonas, 1995). A detecção de elementos “PIP box” ou de uma sequência similar constitui-se numa ferramenta para identificação de genes cuja expressão é alterada quando o patógeno entra em contato com plantas cítricas.

As tecnologias de macroarranjos e microarranjos de DNA constituem-se em poderosas ferramentas para o monitoramento simultâneo do perfil de expressão de muitos genes, permitindo uma análise em larga escala dos fenômenos biológicos que ocorrem em células, tecidos ou organismos (Zhao *et al.*, 1995; Cox, 2001).

O objetivo deste trabalho foi identificar em *Xac*, através da técnica de macroarranjo, a expressão diferencial e temporal de genes contendo promotores induzíveis pela planta hospedeira (“PIP box”). Esse conhecimento deve permitir uma melhor compreensão dos mecanismos específicos de reconhecimento genético de plantas hospedeiras pela *Xac*, bem como as consequências desta interação na adaptação da bactéria em diferentes momentos durante a progressão da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cancrose e o Agente Etiológico

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* constituem um dos grupos de fitopatógenos mais dispersos na natureza, com capacidade de infectar aproximadamente 120 diferentes tipos de plantas monocotiledôneas e 270 dicotiledôneas (Leyns *et al.*, 1984). A capacidade de infectar uma grande variedade de plantas torna o estudo das *Xanthomonas* de grande interesse para a pesquisa básica, assim como para a pesquisa aplicada, pois a produtividade de diversas culturas de interesse agrônomo pode ser seriamente afetada por doenças causadas por bactérias deste gênero (Leite *et al.*, 1987; Leite, 1990).

De acordo com a classificação filogenética de bactérias, baseada em comparações de seqüências nucleotídicas, principalmente do rRNA 16S, o gênero *Xanthomonas* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe “Gammaproteobacteria” (Classe III), ordem “Xanthomonadales” (Ordem II) e família “Xanthomonadaceae” (Garrity & Holt, 2000). Esse gênero possui ainda a característica marcante de formar colônias amarelas em meio Nutriente Ágar devido à produção do pigmento xantomonadina (Bradbury, 1993).

Existe uma diversidade de tipos de cancro cítrico que acometem uma extensa gama de plantas hospedeiras, sendo que, esses tipos podem ser classificados com base na planta cítrica hospedeira (patovar) e nas características fisiológicas e culturais da bactéria *Xanthomonas axonopodis* (syns. *X. campestris*, *X. citri*) como: sensibilidade a bacteriófagos (Civerolo, 1984), sorologia (Alvarez *et al.*, 1991), perfis plasmidiais (Pruvost *et al.*, 1992), homologia de DNA-DNA (Egel *et al.*, 1991) e através de técnicas de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e RFLP (“Restriction Fragment Length

Polymorphism”) (Cubero & Graham, 2002; Hartung, 1992; Hartung & Civerolo, 1989; Hartung *et al.*, 1993; Hartung *et al.*, 1996; Vernière *et al.*, 1998).

O cancro cítrico Asiático (cancrose A), causado por um grupo de isolados oriundos da Ásia, é a forma mais propagada e agressiva da doença e é causado pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* Starr & Garces emend. Vauterin, *et al.* pv. *citri* (Hasse) Dye [syn. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hasse) Dye]. Em 2002, com a publicação do seqüenciamento completo do genoma da bactéria (Da Silva *et al.*, 2002), os autores utilizaram a abreviatura *Xac* para a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, nomeação esta que foi amplamente aceita e que será utilizada também no presente trabalho quando nos referirmos a este fitopatógeno. Em 1984, na Flórida, uma pequena variação genética foi detectada em isolados bacterianos de uma canrose A atípica, constituindo um grupo de *Xac* menos agressivo quando comparado com aquele causador da canrose asiática (Vernière *et al.*, 1998; Gottwald *et al.*, 2002; Amaral, 2003).

A canrose B ou “falso cancro” é causada por *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe B (*Xaa-B*). Originalmente encontrada na América do Sul, a *Xaa-B* ocorre em limão verdadeiro, limão galego, laranja azeda e pomelo; já a canrose C, causada por *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe C (*Xaa-C*), infecta apenas limoeiro Galego e foi originalmente detectada em plantas no estado de São Paulo e está restrita ao Brasil (Amaral, 2003). Embora a canrose B ocorra em vários hospedeiros, ela é caracterizada por uma lenta progressão da doença e pela baixa agressividade do patógeno quando comparada à canrose A, enquanto que o fitopatógeno da canrose C, por ser específico de limão galego, causa HR (resposta de hipersensibilidade) em outras plantas cítricas, como ilustrado na **Figura 1**.

Figura 1. Sintomas induzidos em folha de limão cravo após inoculação com *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*); *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe B (*Xaa-B*) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolii* estirpe C (*Xaa-C*).

O cancro cítrico causado pela bactéria *Xac* (cancrose A) foi relatado pela primeira vez no Brasil em 1957, na região de Presidente Prudente, SP (Bitancourt, 1957) e é a forma mais disseminada e destrutiva da doença. Nas folhas, as lesões iniciais constituem-se de pequenas pústulas, circundadas ou não por um halo amarelo, nos dois lados da folha. As lesões aumentam de diâmetro e tornam-se pardacentas ou escuras, corticosas e salientes. Em frutos e ramos, os sintomas são semelhantes aos observados em folhas, porém a parte corticosa mais pronunciada e as lesões podem ou não estar envolvidas pelo halo amarelo (Koller *et al.*, 1993) (**Figura 2**). A formação de cancos, com ruptura da epiderme, representa as “portas de saída” para grandes quantidades de bactérias na superfície foliar ou do fruto infectado, constituindo-se em importante fonte de inóculo para a dispersão do patógeno. A dispersão a média distância se dá pelas águas das chuvas e o vento, enquanto a dispersão a longa distância normalmente ocorre através da movimentação do homem ao transportar plantas doentes ou que foram expostas ao ambiente contaminado, assim como através de equipamentos contaminados. Os sintomas do cancro em si não constituem o principal problema

ocasionado pela doença, pois raramente leva à morte da planta, sobretudo no que se refere ao cultivo de laranjas para processamento industrial visando a produção de suco. Entretanto, em resposta ao estresse biótico, a planta responde com a produção de etileno, dentre outras substâncias, levando ao desequilíbrio hormonal (Crozier *et al.*, 2001). Portanto, além dos sintomas típicos de cancrose, o excesso deste hormônio induz a queda prematura do fruto, que por não estar suficientemente maduro torna-se inaproveitável para a produção de suco de laranja, bem como para o consumo “in natura” (Brown, 2001).

Figura 2. Lesões típicas do cancro cítrico em folhas (A), ramos (B) e frutos de laranjeiras (C).
Fonte: www.fundecitrus.com.br.

2.2 Prejuízos Causados pelo Cancro Cítrico

No estado de São Paulo, maior exportador de suco de laranja processado no mundo e segundo maior produtor mundial de laranjas, com uma área cultivada de 820 mil hectares, a progressão do cancro cítrico tem levado a um aumento significativo no número de focos da doença nos últimos anos (http://www.fundecitrus.com.br/est_cancro_br.html#i2004_rural), gerando prejuízos a esta cultura de alto valor econômico em nosso país. O volume movimentado no país pelo agronegócio citrícola superou R\$ 6 bilhões no ano de 2003, gerando milhares de empregos diretos e indiretos. (http://www.fundecitrus.com.br/doencas/campanha.html#lar_economia). Nos Estados Unidos, o cancro cítrico vem se alastrando de maneira preocupante e progressiva desde 1995, após anos de esforços em programas de erradicação da doença, os quais já consumiram mais de U\$200 milhões (Brown, 2001). Ademais, a doença já foi constatada nos Estados Unidos, Argentina, Uruguai, China, Japão, Índia, Austrália (Leite, 1990) e Bolívia (Braithwaite *et al.*, 2001).

Os prejuízos imediatos causados pelo cancro cítrico estimularam programas de erradicação desta doença desde seu primeiro registro no Brasil, no final da década de 50, no estado de São Paulo. Medidas de controle sanitário levaram ao que se pensava ser a erradicação da cancrose no estado de São Paulo em meados da década de 80, período em que a produção de suco de laranja para exportação tornou-se um fator de grande importância na balança comercial brasileira. Após este período, o ressurgimento de novos focos de cancro levou a uma intensificação do programa de erradicação através da Campanha Nacional de Erradicação do Cancro Cítrico (CANECC/SP) (portaria nº 291 do Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento, de 23 de julho de 1997) e, também inspirou a necessidade de se atuar contra esta doença através

de medidas baseadas em uma maior compreensão dos mecanismos de interação planta-patógeno (Berhouet, 1993).

Embora vários programas integrados de erradicação tenham sido implantados nas diferentes áreas citrícolas do mundo, o cancro cítrico tem reaparecido em regiões inicialmente consideradas livres da doença (Schubert *et al.*, 2001; Schubert e Sun, 2003). Recentemente, sentindo-se incapaz de controlar a doença devido à ocorrência de furações que a espalham de maneira incontrolável, o governo americano extinguiu o programa de erradicação do cancro cítrico na Flórida, deixando um futuro incerto para a sobrevivência da citricultura nos Estados Unidos, já que a Flórida é a maior e mais importante região produtora de laranja daquele país.

2.3 As Interações Planta-Patógeno

As bactérias fitopatogênicas podem colonizar a superfície de plantas hospedeiras de maneira epífita, sem causar doença, mas quando adentram os tecidos vegetais ativam a expressão de genes ligados à patogenicidade e virulência, levando à multiplicação e desenvolvimento bacteriano nos espaços intercelulares. As *Xanthomonas* spp. em geral adentram o hospedeiro através de aberturas naturais ou ferimentos (Brown, 2001), porém, outras “portas de entrada” têm sido freqüentemente associadas ao cancro cítrico e sua propagação, como por exemplo as galerias formadas no mesófilo foliar pela larva do minador dos citros (*Phyllocnistis citrella* Stainton). Embora este inseto não seja um vetor da doença, ele intensifica os danos causados pela bactéria (Bergamin Filho *et al.*, 2000; Gravena, 1998). Para se desenvolver no espaço apoplástico da planta, a *Xac* tem que coordenar o seu programa de multiplicação celular à percepção do ambiente representado pelo interior da planta hospedeira, promovendo

assim a indução de genes necessários para que o processo infeccioso se estabeleça com sucesso (Brown, 2001).

As interações entre plantas e bactérias fitopatogênicas podem ser classificadas como compatíveis ou incompatíveis. Na interação compatível, o patógeno invade o tecido vegetal e é capaz de mascarar ou sobrepujar os mecanismos de defesa da planta hospedeira, desenvolvendo-se nos tecidos vegetais e levando à manifestação de sintomas através de mecanismos de patogenicidade e virulência que envolvem a produção de toxinas, secreção de enzimas líticas extracelulares e liberação de fatores de virulência nos meios extra e intracelular da planta. Estes fatores são capazes de modular, interferir ou mesmo suprimir as respostas de defesa da planta (White *et al.*, 2000). Na interação incompatível, o patógeno é restringido ao sítio de infecção. A interpretação molecular para este tipo de interação prediz que um gene de avirulência (*avr*) do patógeno codifica uma proteína elicitora (*Avr*) capaz de interagir especificamente com um receptor da planta (proteína *R*) codificado por um gene de resistência (Flor, 1971; Keen, 1990). A interação, direta ou indireta, do elicitor *Avr* do patógeno com o receptor *R* da planta, leva a uma rápida ativação das vias de transdução de sinais que resulta na resposta de resistência, a qual está freqüentemente associada à reação de hipersensibilidade (HR, “Hypersensitivity Response”). A HR caracteriza-se pela morte celular programada das células vegetais atacadas pelo patógeno e das células adjacentes ao sítio de infecção, levando ao bloqueio e eliminação do patógeno no sítio de infecção (Goodman & Novacky, 1994; Staskawicz *et al.*, 1995). A diferença básica entre a interação compatível e incompatível está relacionada à presença, ausência ou não funcionalidade do gene de resistência na planta ou do gene de avirulência no patógeno.

2.4 Genômica de Bactérias Fitopatogênicas

As seqüências genômicas completas de algumas fitobactérias foram recentemente determinadas, tais como as da *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xylella fastidiosa*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) e *Xac* (Wood *et. al.*, 2001; Buell *et. al.*, 2003; Salanoubat *et. al.*, 2002; Simpson *et. al.*, 2000; Da Silva *et. al.*, 2002; Lee *et. al.*, 2005; Thieme *et. al.*, 2005). O seqüenciamento do genoma de bactérias fitopatogênicas é um importante passo para o entendimento da especificidade dessas bactérias aos respectivos hospedeiros e das diferenças em seus processos de patogenicidade e virulência.

As quatro “Xanthomonadaceae” citadas acima (*Xcc*, *Xoo*, *Xcv* e *Xac*) possuem tamanhos cromossomais similares; entretanto, elas diferem bastante em termos de conteúdo plasmidial. A *Xcv* carrega quatro plasmídeos, a *Xac* possui dois plasmídeos, enquanto que a *Xcc* e a *Xoo* não possuem elemento extra-cromossomal.

O seqüenciamento do genoma da *Xac* possibilitou sua caracterização estrutural, o qual contém um cromossomo circular compreendendo 5.175.554 pares de bases (pb) e dois plasmídios, o pXAC33 (33.699pb) e o pXAC64 (64.920 pb) (Da Silva *et al.*, 2002). O genoma da *Xac* aponta algumas características particulares, que devem estar relacionadas com a capacidade de adaptação do fitopatógeno ao seu hospedeiro, como presença de um grande número de genes codificadores de enzimas degradativas de parede celular e de transporte de açúcares; de genes putativos codificadores de proteínas efetoras de virulência que estão associadas ao sistema de secreção do tipo III (SSTT); genes da biossíntese da goma xantana e de um completo sistema flagelar e de quimiotaxia (Moreira *et al.*, 2004).

2.5 Sistema de Secreção Tipo III

Um especializado sistema de ataque a plantas hospedeiras é encontrado na grande maioria das bactérias fitopatogênicas Gram-negativas, permitindo a injeção de proteínas essenciais para os processos de patogenicidade e virulência diretamente no citoplasma de células vegetais infectadas pelo patógeno. Este aparato, denominado sistema de secreção tipo III ou SSTT (“Type III Secretion System” ou “TTSS”), é conservado entre bactérias patogênicas de plantas e de hospedeiros animais (Hueck, 1998; Cornelis & Van Gijsegem, 2000).

Em fitopatógenos, o SSTT é codificado por um conjunto de genes denominados *hrp* (“hypersensitive response and pathogenicity” ou genes de patogenicidade e resposta de hipersensibilidade), os quais são essenciais para a patogenicidade e conseqüente multiplicação bacteriana no hospedeiro, desencadeando sintomas típicos nas respectivas plantas suscetíveis (Alfano & Collmer, 1997).

Os genes *hrp*, primeiramente caracterizados em *Pseudomonas* spp. (Lindgren *et al.*, 1986), também foram identificados em bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Xanthomonas* spp., *Ralstonia* spp. (localizados no megaplasmídio [Salanoubat *et al.*, 2002]) e *Erwinia* spp (Alfano & Collmer, 1997). Algumas proteínas deste agrupamento de genes (*hrp*) mostraram identidade com vários componentes do SSTT de patógenos bacterianos de animais (*Yersinia*, *Shigella* e *Salmonella*), nos quais proteínas codificadas por genes *hrp* formam uma estrutura tubular do tipo “pilus” capaz de conectar as células bacterianas às do animal, permitindo a translocação de proteínas de virulência da bactéria diretamente para o citoplasma da célula hospedeira animal (Van Gijsegem *et al.*, 1993).

Com exceção das *Agrobacterium* spp., os genes *hrp* estão presentes em todas as bactérias fitopatogênicas biotróficas Gram-negativas e, geralmente, estão organizados em grandes agrupamentos compreendendo mais de 20 genes (Boucher *et al.*, 1987; Steinberger & Beer, 1988; Barney *et al.*, 1990; Arlat *et al.*, 1991; Bonas *et al.*, 1991). Numerosos estudos, utilizando análises de complementação e “Southern blot”, demonstraram que os genes *hrp* estão fisicamente e funcionalmente conservados nas bactérias fitopatogênicas (Arlat *et al.*, 1991; Bonas *et al.*, 1991; Frederick *et al.*, 1991; Kamdar *et al.*, 1993; Lady & Beer, 1992; Leite *et al.*, 1994). Recentemente, foram seqüenciados os agrupamentos *hrp* de *P. syringae* pv. *syringae* (Huang *et al.*, 1995; Preston *et al.*, 1995), *R. solanacearum* (Cunnac *et al.*, 2004a), *E. amylovora* (Kim, *et al.*, 1997), *Xcv* (Wengelnik & Bonas, 1996; Wengelnik *et al.*, 1996a; Wengelnik *et al.*, 1996b), *Xcc*, *Xac* (da Silva *et al.*, 2002) e *Xoo* (Thieme *et al.*, 2005). A análise dos agrupamentos de genes *hrp* presentes nestes fitopatógenos revelou que os mesmos codificam de 19 a 26 proteínas (Bonas *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 1995; Hutcheson, 1997; da Silva *et al.*, 2002) relacionadas tanto ao aparato de secreção como a proteínas de virulência translocadas através do sistema tipo III (efetores). Com relação ao gênero *Xanthomonas*, as quatro patovares citadas acima possuem o agrupamento de genes *hrp* bastante conservado (**Figura 3**), embora em *Xoo* este agrupamento seja maior que nas outras três patovares (*Xac*, *Xcc*, e *Xcv*). Este fato deve-se principalmente à presença de quatro genes de transposases (aproximadamente 6 kb) localizados entre os genes *hpaB* e *hrpF* (**Figura 3**).

Figura 3. Comparação do agrupamento *hrp* de quatro patovares de *Xanthomonas*.

Embora as bactérias fitopatogênicas contendo sistema de secreção do tipo III (SSTT) tenham um padrão geral de regulação gênica via *hrp*, elas são divididas em dois grupos principais com base na organização e na regulação da expressão dos genes *hrp*. O grupo I é composto por *Erwinia* sp., *Pantoea stewartii* e *P. syringae*, enquanto que *Xanthomonas* sp. e *R. solanacearum* constituem o grupo II (Alfano & Collmer, 1997; Gophna, *et al.*, 2003). Nos organismos do grupo I, alguns produtos gênicos (HrpX e HrpY em *P. stewartii* subsp. *stewartii*) são responsáveis pela ativação de *hrc*, *hrp* e genes efetores do sistema de secreção do tipo III (Merighi *et al.*, 2003), e possui HrpL, um membro da família ECF de fatores sigma alternativos, no final da cascata que regula a expressão do agrupamento *hrp* (Xiao *et al.*, 1994; Xiao & Hutcheson, 1994). Em bactérias do grupo II, a ativação transcricional da maquinaria do SSTT parece envolver uma complexa cascata de sinalização em que HrpB e HrpX, reguladores da família Ara-C, são os componentes finais da cascata em *R. solanacearum* (Genin *et al.*, 1992) e *Xanthomonas* sp. (Wengelnik & Bonas, 1996), respectivamente.

As proteínas efetoras secretadas através do SSTT são consideradas de grande importância no contexto das interações patógeno-hospedeiro, tanto em bactérias fitopatogênicas como nas patogênicas de animal. Os estudos, até pouco tempo, mostravam dificuldades na identificação dessas proteínas efetoras, que normalmente possuem seqüências bastante heterogêneas e com funções que abrangem diferentes naturezas, além da ausência de um peptídeo sinal capaz de evidenciar a secreção via maquinaria tipo III. Entretanto, novos estudos têm demonstrado a importância e as vantagens de se conciliar resultados experimentais de translocação de efetoras com estudos de bioinformática (Collmer *et al.*, 2002; Guttman *et al.*, 2002; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002; Cunnac *et al.*, 2004b). De acordo com estes mesmos autores, algumas exigências em termos da seqüência primária de aminoácidos no domínio N-terminal da

proteína podem levar à identificação de efetoras transportadas pelo aparato de secreção tipo III. Para a realização da análise “in silico” deve-se considerar que uma proteína é efetora desde que preencha pelo menos dois dos três requisitos abaixo:

- Alto conteúdo de serina (S) e prolina (P) nos 50 aminoácidos da região N-terminal (maior ou igual a 18% = 9 a.a. ou mais);
- Baixo conteúdo de leucina (L) nos 50 aminoácidos N-terminal (menor ou igual a 6% = 3 a.a. ou menos);
- Ausência de aminoácidos ácidos, ácido aspártico (D) e ácido glutâmico (E), nas 12 primeiras posições.

Esta combinação de estudos permitiu o desenvolvimento de uma ferramenta computacional, facilitando a identificação de proteínas efetoras relacionadas ao SSTT em organismos que possuem seu genoma seqüenciado.

Experimentos utilizando genes repórteres têm demonstrado que os genes *hrp* são ativamente transcritos quando em planta e/ou meio mínimo, enquanto que, em meio de cultura complexo esses genes são expressos em níveis muito baixos (Lindgren, 1997). Cabe salientar que os sinalizadores ambientais que induzem a expressão de genes *hrp* são específicos para cada bactéria em particular.

O estudo do controle da expressão de genes *hrp* tem revelado uma complexidade de funções indispensáveis para o estabelecimento tanto de interações compatíveis como de interações incompatíveis, durante o confronto bactéria-planta.

2.6 Promotores Bacterianos Induzidos Pela Planta

A expressão de genes estruturais do SSTT e de alguns genes efetores é mediada, em parte, pelos produtos gênicos *hrpX* e *hrpG*, ambos encontrados em *Xcc* e *Xac*. Em *Xcv* a expressão de genes *hrp* é controlada pela proteína HrpX (Wengelnik & Bonas, 1996). Em meio mínimo ou “in planta” a expressão do gene *hrpX* é ativada pela proteína HrpG, a qual é um ativador transcricional da família de reguladores do sistema de 2 componentes (OmpR) (Wengelnik *et al.*, 1996a). Em *R. solanacearum*, os genes *hrp* são controlados pelas proteínas HrpG e HrpB, que são, respectivamente, homólogas às proteínas HrpG e HrpX de *Xcv* (Genin *et al.*, 1992; Brito *et al.*, 1999). Muitos genes relacionados à virulência e patogenicidade e regulados pela HrpX em *Xcv* contêm uma sequência consenso de nucleotídeos (TTCGC...N15...TTCGC) localizada na região promotora, que tem sido caracterizada como elemento que induz a expressão gênica na presença da planta e denominada de “PIP box” (Plant-Inducible-Promoter box), como ilustrado na **Figura 4** (Fenselau & Bonas, 1995; Wengelnik & Bonas, 1996; Noël *et al.*, 2002). Esses genes são regulados de maneira dependente da proteína HrpX, que se liga na sequência do “PIP box” ativando a transcrição dos mesmos (Da Silva *et al.*, 2002; Whalen *et al.*, 1993).

Os consensos conservados do tipo “PIP box” foram detectados nas regiões promotoras dos operons *hrpC* (*hrcU*, *hrcV* e *hrpC3*), *hrpD* (*hrcQ*, *hrcR*, *hrcS*, *hpaA*, *hrpD5* e *hrpD6*), e *hrpF* (*hrpF*) de *Xcv*, o que pode ser um indício de que essas sequências conservadas tenham uma importante função no controle da transcrição dos genes desses operons. (Fenselau & Bonas, 1995; Rossier *et al.*, 2000) (**Figura 4**). Como já mencionado, esta sequência consenso, denominada de “PIP box” (TTCGC...N15...TTCGC), foi primeiramente descrita em *Xcv*, e considerada sequência

canônica ou “PIP box” perfeito (Fenselau & Bonas, 1995). Entretanto, este motivo conservado em regiões promotoras foi descrito posteriormente em outros organismos. Em *P. syringae* pv. *syringae* foi verificada a presença do consenso em regiões promotoras, sendo essas seqüências ativadas pela proteína HrpL (Xiao *et al.*, 1994), assim como verificada em *P. solanacearum* (Van Gijsegem *et al.*, 1995), e em ambos os organismos essa seqüência consenso foi denominada de hrp box. Zhu *et al.* (2000) verificaram em *Xoo* a presença de “PIP box” perfeito em regiões promotoras de dois genes estudados, *hpa1* e *hrpB*, e um “PIP box” imperfeito (TTCGC...N15...TTCGT), ou seja, com variação na última base do consenso, localizado na seqüência promotora do gene *hpa2*. Com os seqüenciamentos e comparação dos genomas das fitobactérias *Xac* e *Xcc*, foi identificado seqüências do tipo “PIP box” (TTCG...N16...TTCG) associadas a genes de patogenicidade e virulência, em ambos os genomas (Da Silva *et al.*, 2002). Da mesma maneira, em *R. solanacearum*, Salanoubat *et al.* (2002) verificaram a presença do consenso canônico em regiões promotoras de seis genes. Posteriormente, Cunnac *et al.* (2004a) realizaram uma análise computacional na seqüência genômica de *R. solanacearum* (GMI1000) utilizando como base a seqüência TTCG...N16...TTCG, ou seja, com pequena variação na seqüência canônica primeiramente descrita em *Xcv*, e identificaram motivos conservados em regiões promotoras da bactéria. A análise gerou 95 seqüências consensos e foram renomeadas como hrp_{II} box, e as ORFs referentes a essas seqüências promotoras tornaram-se candidatas à regulação via proteína HrpX.

Figura 4. Modelo da regulação gênica do agrupamento *hrp* em *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Fonte da Figura: Büttner & Bonas, 2002, com modificações).

Os estudos acerca da funcionalidade de “PIP box” foram intensificados com o sequenciamento completo de genomas de bactérias fitopatogênicas. Furutani *et al.* (2004) e Tsuge *et al.* (2005) demonstraram em *Xoo* a funcionalidade de produtos gênicos secretados relacionados a patogenicidade e contendo promotores do tipo “PIP box”. Cunnac *et al.* (2004b) relataram diminuição da atividade do promotor após substituições de nucleotídeos na sequência do “PIP box” em ensaios “in vitro” de ativação da expressão de gene repórter em *R. solanacearum*. Desta forma, sequências “PIP box” ou hrp_{II} box podem ser utilizadas como marcadores para identificação de genes cuja expressão é modificada durante o ataque da bactéria à planta hospedeira, tais como os genes codificadores de proteínas que compõem estruturalmente a maquinaria de secreção, os que codificam proteínas efetoras de virulência secretadas pelo sistema de secreção do tipo III, bem como os de proteínas envolvidas no “fitness” bacteriano durante o ataque ao hospedeiro.

O uso de técnicas de arranjos de DNA é uma das abordagens que visa a análise genômica funcional para a elucidação de vias de transdução de sinais, possibilitando a identificação de novos genes envolvidos no processo de patogenicidade, virulência e adaptação na interação do fitopatógeno e seu hospedeiro. Ademais, a identificação de genes do patógeno diferencialmente expressos no contato com o hospedeiro, relacionados à adaptação e arsenal de ataque, representa um passo importante para o desenvolvimento de moléculas antimicrobianas (“drug design”) capazes de agir no controle do cancro cítrico.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Identificar em *Xac* a expressão diferencial e temporal de genes contendo promotores induzíveis pela planta hospedeira (“PIP box”).

Objetivos Específicos

- Mapear, no genoma da *Xac*, genes associados a possíveis sequências promotoras do tipo “PIP box”;
- Identificar, por meio de macroarranjos de DNA genômico bacteriano, genes associados a “PIP box” e diferencialmente expressos durante uma cinética de infecção de *Xac* em plantas hospedeiras;
- Analisar os genes diferencialmente expressos para melhor compreender os mecanismos específicos de reconhecimento genético de plantas hospedeiras pela *Xac*, bem como as consequências desta interação na adaptação da bactéria em diferentes momentos durante a progressão da doença;
- Avaliar a funcionalidade de promotores “PIP box” através da técnica de gene repórter (*gus*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Mapeamento “in silico” dos Genes Contendo Promotores “PIP box”

O mapeamento de genes contendo possíveis promotores do tipo “PIP box” foi realizado com o auxílio de uma ferramenta de bioinformática, escrita em linguagem Perl, desenvolvida pela bioinformata Renata Izabel Dozzi Tezza do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBM) da Unesp de Jaboticabal, e acessando informações dos genes em Banco de Dados padrão SQL do site do Projeto de seqüenciamento da *Xac*.

Seqüências consenso com intervalo de 15 ou 16 nucleotídeos (**Figura 5**) e posicionados a uma distância de 10 a 1.000 pares de bases a 5’ do início (“upstream”) de uma ORF (“open read frame”) serviram como base para se buscar os possíveis “PIP box” no genoma da bactéria *Xac* (**Figura 6**). Para o consenso com intervalo de 15 nucleotídeos foram utilizadas posições degeneradas, ou seja, a 5ª base do consenso 5’-TTCGN...N15...TTCGN-3’ foi degenerada, para uma das fitas do DNA, assim como a 1ª base do consenso 5’-NCGAA...N15...NCGAA-3’ para a fita complementar. Para o intervalo de 16 nucleotídeos foi utilizado apenas o consenso 5’-GCGAA...N16...GCGAA-3’ para uma fita e, 5’-TTCGC...N16...TTCGC-3’ para a fita de DNA complementar (**Figura 5**).

Figura 5. Sequências consensos (“PIP box”) mapeadas no genoma da *Xac*. (**A**) Consenso com intervalo de 15 nucleotídeos; (**B**) Consenso com intervalo de 16 nucleotídeos. **N** corresponde a base degenerada.

Figura 6. Esquema geral do posicionamento do “PIP box” no genoma da *Xac*. A *Xac* possui 4.313 ORFs (Da Silva *et al.*, 2002) e aqui está representado o “PIP box” de apenas uma ORF.

4.2 Seleção dos Clones PIP-Candidatos

Após o mapeamento dos elementos “PIP box” por bioinformática, foram buscados no banco de dados do genoma da *Xac* os clones de “shotgun” (utilizados no sequenciamento do genoma) contendo as ORFs associadas aos elementos “PIP box”. Os clones de bactérias contendo as ORFs com “PIP box” candidatas clonadas em plasmídeo foram recuperados e rearranjados com o auxílio do robô Q-bot (Genetix) em placas de 96 poços. Após a seleção, os plasmídeos recombinantes contendo as ORFs com “PIP box” tiveram seus DNAs extraídos para confirmação da identidade dos clones por sequenciamento.

4.3 Mini Preparação de DNA Plasmidial

As preparações de DNA plasmidial foram realizadas utilizando o método de lise alcalina, com modificações, segundo a metodologia descrita em <http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/Downloads/downloads.html>:

1. As culturas de bactérias foram cultivadas em placas “deep well”, de 96 poços de 2 mL cada, por 22 horas a 37°C, com agitação de 300 rpm (Shaker New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey), em 1,5 mL de meio CG (CIRCLEGROW, Q-Bio gene) contendo ampicilina numa concentração final de 0,05mg/mL;
2. Após o cultivo, a placa foi centrifugada por 6 minutos a 4.000 rpm (Centrífuga Hettich, D78532, Tuttlingen, Germany), a 4°C;
3. O sobrenadante foi descartado;

4. Em cada poço da placa adicionou-se 240 μL de GET (23 mL de glicose 20%, 10 mL de EDTA 0,5 M, $\text{pH}=8,0$ e 13 mL de Tris-HCl 1 M, $\text{pH}=7,4$). A placa foi então vedada com selo plástico e agitada em “vortex” até a dissolução do “pellet”;
5. A placa foi centrifugada por 6 minutos a 4.000 rpm, sob a temperatura de 4°C e em seguida o sobrenadante foi descartado;
6. Adicionou-se, em cada poçinho, 85 μL da solução de GET + RNase (10 mg/mL). A placa foi novamente vedada com selo plástico e agitada em “vortex” até a dissolução do “pellet”;
7. Um volume de 60 μL desta solução foi então transferido para uma placa “deep well” de 250 μL e, em seguida foi adicionado 60 μL de solução de lise (1,3 mL de SDS 10%, 650 μL de NaOH 4M e 13 mL de H_2O Milli-Q autoclavada). A placa foi vedada com selo plástico e o conteúdo foi misturado por inversão;
8. A placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, e em seguida, procedeu-se uma rápida centrifugação;
9. Foi adicionado, em cada poço da placa, 60 μL de acetato de potássio 3 M gelado pH 4,8 e a mesma foi novamente selada e o conteúdo misturado por inversão;
10. A placa foi mantida em temperatura ambiente por 10 minutos, seguida de rápida centrifugação;
11. O selo utilizado para vedação da placa foi retirado e a placa foi colocada em estufa a 90°C por 30 minutos;
12. Após esse período a placa foi colocada no gelo por 10 minutos e, novamente vedada com selo;
13. Seguiu-se a centrifugação da placa por 5 minutos a 4.000 rpm, a 20°C ;

14. Após a centrifugação, o sobrenadante (aproximadamente 150µL) foi transferido para uma placa sem fundo e contendo filtro, de maneira que uma outra placa “deep well” ficasse sobreposta a ela e ambas presas com fita adesiva;
15. O sobrenadante foi filtrado através de centrifugação por 5 minutos a 4.000 rpm, a 20°C;
16. O filtro foi retirado e adicionou-se 110 µL de isopropanol 100 % na placa “deep well” contendo os filtrados;
17. A placa foi lacrada com selo de alumínio e o conteúdo foi misturado por inversão;
18. Em seguida a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4.000 rpm e a 20°C. O sobrenadante foi descartado;
19. Foi adicionado, em cada poço, 200 µL de etanol 70% gelado;
20. A placa foi centrifugada por 5 minutos a 4.000 rpm, a 20°C, e o sobrenadante foi descartado;
21. A placa contendo os DNAs plasmídias foi seca a vácuo por 5 minutos;
22. Foi adicionado, em cada poço, 110 µL de H₂O Milli-Q autoclavada. A placa foi mantida então em temperatura ambiente por um período de aproximadamente 14 horas para que o “pellet” de DNA plasmidial fosse totalmente solubilizado.
23. Após esse período a placa foi guardada em freezer a -20°C.

4.4 Reação de Sequenciamento e Análise das Sequências

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de 96 poços segundo o método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeo (Sanger *et al.*, 1977), utilizando a química do “BigDye Terminator” da Applied Biosystems (ABI), por

extensão de cadeia com polimerase (PCR). Para a reação de PCR foi utilizado 2 µL de DNA plasmidial (300 a 400 ng), 7 µL de tampão “Save Money” 2,5 X (5mM MgCl e 200 mM TrisHCl pH9,0), 1µL de “primer” pUC “Forward” ou “Reverse” (5 pmoles/µL), 1 µL do corante “BigDye” versão 3.0 e 9 µL água Milli-Q autoclavada. Os ciclos utilizados foram 96°C por 2 minutos, seguido por 39 ciclos de 96° C por 30 segundos, 52° C por 30 segundos e 60° C por 4 minutos. Após a reação de PCR, as amostras foram lavadas. A lavagem foi realizada da seguinte forma:

- Adicionou-se 100 µL de isopropanol a 75% em cada poço e a placa foi mantida por 15 minutos em temperatura ambiente;
- A placa foi centrifugada por 30 minutos a 4.000 rpm, a 22° C, e o sobrenadante foi descartado;
- Adicionou-se 200 µL de etanol 70% em cada poço da placa e a mesma foi centrifugada por 10 minutos a 4.000 rpm, a 22° C, e o sobrenadante foi descartado (essa etapa foi repetida por mais uma vez);
- A placa foi colada invertida na centrífuga, procedendo uma rápida centrifugação com aceleração e desaceleração baixa;
- Em seguida a placa foi seca por 5 minutos a vácuo;
- A placa foi guardada a -20° C até o momento do seqüenciamento, quando o “pellet” de cada poço foi então dissolvido em 10 µL de formamida deionizada. A placa foi aquecida por 5 minutos a 95° C em termociclador e, após 2 minutos no gelo, foi colocada seqüenciador.

O seqüenciamento foi realizado em Seqüenciador automático ABI PRISM 3700 DNA Analyzer, da Applied Biosystems. As seqüências foram submetidas ao banco de dados do Projeto Genoma da *Xac* para comparação com as seqüências armazenadas e validação dos clones utilizados.

4.5 Confecção das Membranas de Macroarranjo

Para confecção das membranas de macroarranjo, os DNAs plasmidiais dos clones contendo “PIP box” obtidos pela mini-preparação e validados por sequenciamento foram ordenados e imobilizados em membranas de náilon (Raybond-N+, Amersham) com auxílio do robô Q-Bot (Genetix) do BCCC (Brazilian Clone Colletion Center) (**Figura 7**). As amostras foram depositadas em duplicata, sendo que cada clone foi depositado três vezes no mesmo ponto, com espaçamento de 900 micras entre cada ponto, num arranjo 3X3 (**Figura 8**). Em seguida as membranas foram submetidas a tratamento primeiro em solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) e depois de neutralização (NaCl 1,5 M e Trizma 1 M) por 5 e 10 min., respectivamente e, posteriormente, fixou-se o DNA à membrana por radiação com luz UV (1600 joules/cm²), seguindo as recomendações do fabricante (Genetix,UK). Essas membranas foram estocadas em temperatura ambiente até o momento de uso.

Figura 7. Robô Q-bot (Genetix) utilizado para rearranjar placas contendo clones e para depositar o DNA plasmidial dos mesmos na membrana de náilon.

Figura 8. Esquema da membrana de náilon confeccionada contendo os 208 clones em duplitaca, num arranjo 3x3.

4.6 Inoculação de *Xac* em Folhas de Laranjeira

Folhas de laranjeira pêra (*Citrus sinensis*) foram inoculadas pelo método de infiltração, utilizando uma seringa de 1 mL sem agulha, de forma que todo o limbo foliar fosse infiltrado com uma suspensão de *Xac* a 10^8 UFC/mL (**Figura 9**). Para o experimento com coleta a 3 dias após infecção foram inoculadas aproximadamente 240 folhas jovens. Para o experimento com coleta 5 dias após a infecção foram inoculadas em torno de 180 folhas jovens. Três ou cinco dias após a inoculação, as células bacterianas foram coletadas por exsudação em solução salina gelada (NaCl 0,85% p/v), a partir das folhas inoculadas (**Figura 9**), para a recuperação das bactérias multiplicadas em planta hospedeira e posterior extração do RNA total.

As plantas inoculadas foram mantidas num laboratório de segurança concebido especialmente para a manipulação e inoculação de *Xac* em plantas hospedeiras, localizado nas dependências do Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular (LBM/UNESP/Jaboticabal), sob condições ótimas de temperatura, luminosidade, umidade, e contendo equipamentos de filtragem absoluta do ar para a contenção do organismo fitopatogênico.

Figura 9. Inoculação de *Xac* em folhas de laranjeira através da técnica de infiltração e recuperação da bactéria por exsudação a 3 e 5 dias após a inoculação.

4.7 Cultivo de *Xac* em Meio Indutivo XAM1 e em Meio Caldo Nutriente

De acordo com Wengelnik *et al.* (1996b), o meio sintético XVM2 mimetiza os espaços apoplásticos da planta hospedeira de *Xcv*, sendo capaz de induzir genes *hrp* quando cultivada neste meio.

Em virtude da inviabilidade experimental de se inocular um grande número de folhas de laranjeiras para recuperar quantidades suficientes de células bacterianas nos tempos precoces (menos de 24 horas) da cinética de infecção, optamos por cultivar a *Xac* por 12 e 20 horas no meio indutivo XAM1 (XVM2 com modificações, segundo comunicação pessoal de Frank F. Withe, contendo 7,4 mM (NH₄)₂SO₄; 16 mM KH₂PO₄; 30 mM K₂HPO₄; 1,6 mM citrato de sódio (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O); 10 mM frutose; 10 mM sacarose; 1 mg/mL BSA; pH=5,4), por 12 e 20 horas. O cultivo da *Xac* em meio Caldo Nutriente (CN) rico (5 g de peptona; 3 g de extrato de carne para um volume de 1000 mL) serviu como controle do experimento.

4.8 Extração de RNA de *Xac*

Após a recuperação das células bacterianas das folhas de laranjeiras (3 e 5 dias após inoculação) em solução salina gelada e do cultivo das mesmas em meio indutivo XAM1 (12 e 20 horas) e em meio CN rico, estas foram centrifugadas e seguiu-se o protocolo de extração de RNA descrito por Chomczynski & Sacchi (1987):

1. A suspensão bacteriana foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante foi descartado. Cabe aqui salientar que, para cada condição experimental, foram feitas 6 extrações independentes.

2. O sedimento de células bacterianas foi ressuspensionado em 4 mL de Trizol® (Invitrogen) e mantido por 5 minutos a 25°C;
3. Adicionou-se 1,6 mL de clorofórmio e a mistura foi homogeneizada;
4. Em seguida a mistura foi mantida por 3 minutos a 25°C para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas;
5. A mistura foi centrifugada a 7.500 x g por 10 minutos, a 5°C;
6. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi realizada mais uma extração com clorofórmio;
7. O volume foi centrifugado a 7.500 x g por 10 minutos, a 5°C;
8. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o RNA foi precipitado pela adição de ½ do volume de álcool isopropílico;
9. A mistura foi mantida a 25°C por 10 minutos, seguida de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, a 5°C;
10. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 5 mL de etanol 75%, para lavagem do mesmo;
11. O tubo foi centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos, a 5°C, e o sobrenadante foi descartado;
12. O precipitado de RNA foi seco em temperatura ambiente e solubilizado em 50 µL de água livre de RNase (água Milli-Q tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato [DEPC] e autoclavada);
13. A absorbância da solução de RNA foi determinada a 260 nm e 280 nm (A₂₆₀ nm é utilizada para calcular a concentração de ácidos nucleicos e a razão A₂₆₀ nm/A₂₈₀ nm indica a presença ou ausência de proteína como contaminante). A quantidade de ácidos nucleicos foi estimada para cada amostra;

14. As amostras de RNA foram analisadas utilizando 2 µg de RNA total em gel desnaturante contendo 1,5% de agarose.

4.9 Eletroforese em Gel de Agarose Desnaturante

As amostras de RNA total foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante contendo 1,5 % de agarose em tampão “Running Buffer” (20 mM MOPS, (ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico) pH 7,0; 5 mM acetato de sódio, 5 mM EDTA e 3 % de formaldeído). Em alíquotas de 2 µg de RNA total foram adicionados 14,5 µL de tampão da amostra (66,7% formamida, 8% formaldeído, 0,4% azul de bromofenol dissolvidos em “Runnig Buffer”), 0,5 µL de brometo de etídeo (10 mg/mL), o volume final foi ajustado para 18 µL com água tratada com DEPC e este volume foi então aplicado no gel de agarose. Após a eletroforese o gel foi revelado pela incidência de luz ultravioleta. A integridade dos RNAs foi verificada pela observação da intensidade relativa das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 16S e 23S.

4.10 Síntese das Sondas de cDNA

A síntese das sondas de cDNA marcadas com [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP foram realizadas a partir de RNA total extraído de bactéria em estágio não infectante, cultivada em meio CN (controle); de bactéria infectante (bactéria recuperada de folhas de laranjeiras após 3 ou 5 dias da inoculação) e de bactéria cultivada em meio indutivo XAM1 por 12 e 20 horas. O protocolo utilizado para a síntese da sonda de cDNA foi o descrito por

Schummer *et al.* (1999) com modificações, e que pode ser encontrado em <http://cafe.cbmeg.unicamp.br/protoc/sondacdna.htm>.

Em um tubo de microcentrífuga, de 1.500 µL, foram adicionados: 30 µg de RNA total (em um volume de 6 µL) e 156 pmoles (2 µL) de hexa-oligonucleotídeos não específicos (“random primer” pd(N)₆, da Amersham). O conteúdo deste tubo foi homogeneizado, centrifugado rapidamente e aquecido a 75°C por 10 minutos, e em seguida foi colocado no gelo. Foi adicionado à reação: 5 µL do tampão de síntese da primeira fita (5x, BRL); 2,5 µL de DTT 100 mM; 2,0 µL de RNase Out® (Invitrogen); 2,5 µL de dNTPs (A, T e G, 10 mM cada) e 3 µL de [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP (30µCi). Essa mistura foi aquecida a 42°C por 5 minutos antes de adicionar 1,25 µL da enzima SuperScript III RNase H⁻ Reverse Transcriptase (200 U/µL, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O tubo contendo a reação foi homogeneizado e centrifugado rapidamente. Em seguida o tubo foi mantido a 25°C por 30 minutos. Após esse período foi adicionado 1,25 µL de dCTP (10mM) e a reação foi novamente incubada a 25°C por mais 2 horas. Após este período a sonda foi desnaturada a 95°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado ao tubo 1,4 µL de NaOH 5 M, seguida de homogeneização e rápida centrifugação, e o tubo foi incubado a 37°C por 15 minutos. Após esse período foram adicionados 1,8 µL de HCl 3,9 M e 7,0 µL de Tris-HCl 1 M pH 7,5 e o volume final foi ajustado para 50 µL com água Milli-Q. Antes da purificação das sondas marcadas, esse volume de 50 µL foi contado no cintilador. Em seguida prosseguiu-se à remoção do [$\alpha^{33}\text{P}$] dCTP não incorporado às sondas, que foi realizado aplicando-se o volume de 50 µL em colunas de Sephadex G-50 previamente montadas em seringas de 1 mL contendo lã de vidro siliconizada em suas extremidades inferiores e equilibradas com STE pH 8,0 (NaCl 100 mM; Tris 10 mM e EDTA 1 mM) (Sambrook *et al.*, 1989) para a retirada de [$\alpha^{33}\text{P}$]

dCTP não incorporado. As colunas contendo as sondas marcadas foram centrifugadas a 4.000 rpm (centrífuga FANEM, MOD. 205 N, Rotor 8x15 mL, Ind. Brasileira) por 5 minutos, e o volume foi recuperado em tubo de microcentrífuga de 1,5 µL posicionado logo abaixo das colunas. Em seguida foram adicionados 100 µL de STE e as colunas foram novamente centrifugadas. Os volumes finais recuperados após as centrifugações foram novamente contados em cintilador. A relação do valor em CPM entre sonda purificada e não purificada indica a eficiência da incorporação da sonda, que deve ser no mínimo de 30% (Schummer *et al.*, 1999).

4.11 Pré-hibridação e Hibridação das Membranas de Macroarranjo

As pré-hibridações, hibridações e lavagens das membranas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por McPherson (2000) e encontrado em <http://cafe.cbmeg.unicamp.br/protoc/overgo.htm>. Para diminuir o “background” as membranas foram inicialmente tratadas com uma solução fervente de SDS 0,1%, seguindo as recomendações do fabricante.

As pré-hibridações foram realizadas a 58°C, utilizando 13 mL por membrana de solução contendo 1% BSA, 7% SDS ultrapuro e 0,5% de tampão fosfato de sódio 1M, em cilindros de vidro especiais para esta finalidade (7 x 3,5 cm), por 4 horas na primeira vez que foram utilizadas e por 2 horas em hibridações subsequentes, a 58°C. A hibridação propriamente dita foi realizada com a mesma solução utilizada na pré-hibridação, à qual foram adicionadas as sondas purificadas e previamente desnaturadas a 95°C por 5 minutos.

As membranas de macroarranjo, contendo os genes possivelmente controlados por “PIP box”, foram hibridadas com as sondas radioativas por um período de 18 horas, a 58°C, em forno de hibridação Hybaid (Halbrook, New York). Após esse período as membranas foram lavadas.

4.12 Lavagem das Membranas

Após a hibridação, procedeu-se à lavagem das membranas para retirada do excesso de sonda e das hibridações inespecíficas que possivelmente tenham ocorrido. As membranas foram lavadas três vezes, por períodos de 30 minutos, a 58°C, de maneira sucessiva, com aproximadamente 50 mL das seguintes soluções: 2xSSC + 0,1% SDS; 1,5xSSC + 0,1% SDS e 0,5xSSC + 0,1% SDS. Após a última lavagem as membranas foram removidas da solução e seladas em sacos plásticos para exposição em cassetes, com ausência de luz (Imagem Plate-Fujifilm), por um período de 96 horas. As imagens captadas e digitalizadas foram adquiridas através de um leitor de fósforo radioativo (Phosphoimager FLA3000-G – Fujifilm, Tokyo).

4.13 Recuperação das Membranas Após as Hibridações

As membranas utilizadas em um experimento de hibridação tiveram a sonda removida, de maneira que estas membranas pudessem ser utilizadas novamente. Para a remoção da sonda as membranas foram lavadas duas vezes, por períodos de 15 minutos, com 100 mL/membrana de solução pré-aquecida a 65°C e contendo 0,4N NaOH + 0,1%

SDS. Em seguida procedeu-se nova lavagem por duas vezes, a temperatura ambiente, com uma solução contendo 0,1% SDS + 0,1% SSC + 0,2N Tris-HCl pH 8,0. As membranas foram novamente seladas e colocadas nos cassetes por períodos de 96 horas. A eficiência da remoção da sonda foi monitorada repetindo-se o processo de leitura no “Phosphoimager”.

4.14 Análise Estatística das Híbridações dos Macroarranjos

Os arquivos das imagens obtidas no “Phosphoimager” foram analisados utilizando-se o programa ArrayVision (Imaging Research, www.imagingresearch.com). Os arquivos gerados a partir do programa ArrayVision foram exportados para uma planilha eletrônica, onde os valores de expressão foram computados para cada gene a partir da mediana do sinal bruto obtido menos o valor do “background” local. Em seguida, os valores de intensidade líquidos para cada gene foram salvos em um arquivo texto e importados para o programa estatístico R (R Development Core Team, 2005; Ihaka & Gentleman, 1996). No ambiente R, primeiramente foi executada a normalização dos dados utilizando o pacote “vsn” (Huber et al., 2002). O uso do “vsn”, além de normalizar, realiza uma estabilização das variâncias, permitindo realizar comparações entre os diferentes experimentos de macroarranjos. A fim de verificar se o processo de normalização dos dados estavam aceitáveis, gráficos do tipo “boxplot” para cada arranjo, gráficos de dispersão das densidades e de correlação entre os arranjos foram gerados do pacote “geneplotter” e examinados visualmente. Os genes diferencialmente expressos para cada contraste de interesse foram obtidos através das funções estabelecidas no pacote “limma” (Smyth, 2005). Os genes foram classificados

- XAC2370 5'-TAGTGATTACCGACGTGC-3' (“Foward”)
 5'-ACAGGTTACGGATTGCTG-3' (“Reverse”)
- XAC4291 5'-TAAGTGAAGAGTTTG-3' (“Foward”)
 5'-AGGGTATCTAATCCTGTTTG-3' (“Reverse”)

“Amplicons” de 209 pb, 302 pb, 942 pb e 800 pb foram verificados para as XACs 0398, 0416, 2370 e 4291, respectivamente.

Antecedendo as reações de RT-PCR, faz-se necessário o tratamento dos RNAs extraídos da *Xac*, no estágio infectante e no estágio não infectante, com DNase livre de RNase.

4.15.1 Tratamento de RNAs com DNase

Os RNAs totais extraídos da *Xac* no estágio infectante (cultivada por 12 e 20 horas em meio indutivo XAM1 e recuperada da planta aos 3 e 5 dias após a inoculação) e no estágio não infectante (cultivada em meio CN) foram tratados com DNase para a remoção de possíveis contaminantes de DNA genômico nas referidas amostras. Para tanto, foi utilizada a enzima desoxirribonuclease I (“Deoxyribonuclease I, Amplification Grade”, Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. Após tratamento com DNase esses RNAs foram utilizados para a reação de RT-PCR semi-quantitativa. Como controle das reações de RT-PCR, os mesmos RNAs tratados com DNase foram utilizados para realização de uma PCR comum, com a enzima “Taq polimerase”, a fim de confirmar a ausência de DNA na amostra.

4.15.2 RT-PCR Semi-quantitativa

Para as reações de RT-PCR foi utilizado o kit "SuperScriptTM One-Step RT-PCR with Platinum Taq®" da Invitrogen, de acordo com as especificações do fabricante. As reações foram realizadas com 250 ng de RNA tratado com DNase, em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf BioResearch, Hamburg, Germany), com um ciclo inicial de 50°C por 30 minutos para a síntese de cDNA, seguido de ciclagem de PCR constituída por uma desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos e 20 ciclos de 95°C por 45 segundos, seguidos da temperatura de anelamento adequada para cada oligonucleotídeo iniciador por 45 segundos, e 72°C de extensão por no mínimo 30 segundos (esta extensão varia de oligo para oligo, sendo que se recomenda 1 minuto para cada 1 Kb de fragmento amplificado), e uma extensão final de 10 minutos por 72°C. O volume total da reação (25 µl) contendo os produtos amplificados foi aplicado em gel de agarose 1,2% em tampão TBE 1X (Tris, ácido bórico e EDTA) e submetido à eletroforese (3V/cm). Após a eletroforese o material contido no gel foi transferido para membrana de náilon pelo método de "Southern blot" (Sambrook *et al.*, 1989). Essa membrana foi então utilizada para validar a expressão diferencial de genes que contém consenso "PIP-box" evidenciados no macroarranjo, utilizando como sonda, fragmentos de PCR purificados correspondentes à sequência dos respectivos genes amplificados a partir de DNA genômico da *Xac*.

4.15.3 “Southern blot”: Marcação de Sonda e Hibridação

As sondas utilizadas na hibridação dos “blots” contendo o produto das reações de RT-PCR, correspondentes aos genes XAC0398, XAC0416, XAC2370 e XAC4291, foram obtidas por amplificação por PCR do DNA genômico da bactéria. As reações de PCR foram efetuadas usando 1/10 de volume do tampão da enzima, 0,2 mM do mix de dNTPs (A, T, C, G), 2 mM de $MgCl_2$, 0,4 pmoles de cada oligonucleotídeo, 0,2 U de Taq polimerase (Gibco) e 100 ng de DNA genômico. Os ciclos de PCR utilizados foram: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 45 segundos de temperatura de anelamento (a temperatura foi adequada para cada oligonucleotídeo iniciador), 72°C de extensão por no mínimo 30 segundos (esta extensão varia de oligo para oligo, sendo que se recomenda 1 minuto para cada 1 Kb de fragmento amplificado), e uma extensão final de 5 minutos por 72°C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% e as sondas foram purificadas do gel para serem utilizadas na hibridização das membranas. Para a purificação dos fragmentos amplificados do gel de agarose foi utilizado o produto “S.N.A.P.TM gel purification kit” (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

A marcação direta das sondas de DNA foi realizada utilizando a enzima fosfatase alcalina termoestável e um agente quimiluminescente. Para tanto, foi utilizado o kit “Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System” (Amersham Biosciences). Este sistema de marcação e detecção é baseado na quimiluminescência do dioxetano. Isto envolve a marcação direta dos ácidos nucléicos utilizados como sonda com a enzima fosfatase alcalina termoestável. Esta marcação é alcançada pela completa desnaturação da sonda, permanecendo na forma de fita simples, seguido do “crosslinking” (ligação) covalente da enzima com o ácido nucléico (sonda marcada). O

reagente de detecção quimiluminescente CDP-*Star*TM (solução aquosa contendo 1,5% (w/v) de disódio 2-cloro-5-(4 metoxispiro [1,2-dioxetabe-3,2'-(5'-cloro)-tríciclo[3,3,1,1^{3,7}]decan]-4yl) phenil fosfato) contém o substrato estabilizado dioxetano, que é degradado pela enzima fosfatase alcalina. Desta forma, quando o detector entra em contato com o complexo sonda-fosfatase, que leva à degradação do substrato, ocorre uma rápida emissão de luz por um breve período de tempo.

Os procedimentos de marcação de sonda, pré-hibridação, hibridação, lavagem da membrana e detecção de sinais foram realizados seguindo as recomendações do fabricante.

Após o processo final de geração de quimiluminescência, a membrana foi colocada em um cassete, em contato com um filme de raios-X (MXG/Plus, Kodak) para permitir a detecção do sinal quimiluminescente. A exposição foi feita na ausência de luz, à temperatura ambiente, por um período inicial de uma hora. Após a exposição, o filme foi revelado e fixado com os reagentes da Kodak. Se a exposição por uma hora gerava um sinal fraco no filme de raios-X, procedia-se nova exposição por um período maior utilizando-se um novo filme.

A quantificação do sinal produzido no filme pela sonda de cada ORF foi realizada através de análise densitométrica das autorradiografias em um equipamento Shimadzu modelo CS-9301, em um comprimento de onda de 550 nm, módulo de leitura em transmitância e zig zag. A área debaixo de cada pico foi calculada e representa a intensidade do sinal gerado em cada caso, que é o resultado da hibridação da sonda com o cDNA produzido a partir do RNA transcrito da ORF em questão. Quanto maior a quantidade de RNA transcrito, maior a quantidade de cDNA produzido e maior o sinal produzido no filme.

4.16 Análise de Promotores “PIP box” Através de Ensaio de Gene Repórter

Para verificar se a expressão diferencial de genes de *Xac* que ocorreu na presença da planta hospedeira ou de meio de cultura indutor era mesmo devido à ativação do promotor do gene pela planta ou meio indutor, utilizou-se a estratégia do gene repórter. No presente caso utilizou-se a enzima β -glucuronidase (produto do gene *gus* ou *uidA*), que é capaz de hidrolisar o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-gluc). O produto é um composto de cor azul facilmente visualizado. A região promotora dos genes XAC0416 e XAC0424 foi fusionada à metionina inicial do gene *gus*, um vetor de expressão foi construído para cada promotor, as construções foram colocadas em *Xac* e analisou-se a expressão do gene *gus* em condições de interação ou não da *Xac* com a planta hospedeira ou meio indutivo.

4.16.1 Construção do Vetor pBGUS

O vetor pBluescript SK II (Stratagene), também conhecido como pBSKII, é uma derivação do vetor pUC19, contém aproximadamente 3,0 Kb, e possui marca de seleção ao antibiótico ampicilina (**Figura 10**).

Figura 10. Mapa físico do vetor pBSKII. O sítio múltiplo de clonagem (“polylinker”) é flanqueado pelos promotores T7 e T3, e contém sítios únicos para as endonucleases *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI e *Sac*I, dentre outras.

O gene *gus*, de 1,8 kb, clonado no vetor pBin, foi liberado do mesmo pela digestão com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sst*I (= *Sac*I) e clonado no vetor pBSKII digerido com as mesmas enzimas, dando origem à construção pBGUS.

A reação de ligação do gene *gus* no vetor plasmidial pBSKII foi realizada utilizando-se 2 µL do vetor pBSKII, 4 µL do inserto GUS purificado, 10% do volume final do tampão da ligase (10x) e 1U/µL da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs), com o volume final sendo ajustado para 15 µL. A reação foi mantida a 15° C “overnight”.

Após a ligação do fragmento correspondente ao gene *gus* ao vetor pBSKII, que resultou no vetor pBGUS de tamanho aproximado de 4,8 Kb, este foi utilizado para eletroporar células competentes de *E. coli* DH10B (descrito a seguir) para a obtenção de grandes quantidades do vetor pBGUS. A presença do plasmídio pBGUS nas células de *E. coli* transformadas, na sequência correta, foi confirmada através da extração de DNA plasmidial e sequenciamento automático de DNA dos plasmídeos recombinantes.

4.16.1.1 Eletroporação em Células Competentes de *Escherichia coli*

Para a eletroporação de *E. coli* linhagem DH10B foram utilizados 40 µL de células eletrocompetentes e 2 µL do vetor pBGUS. Essa mistura foi submetida ao eletroporador Gene Pulser II (Biorad) nas seguintes condições: 2,5 KV; 200 r Low Range e 25 µF Low cap. Em seguida foi adicionado 980 µL de SOB (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl₂ e 10mM MgSO₄); 10 µL de Mg⁺⁺ e 10 µL de glicose 2M e a mistura foi então incubada a 37°C sob agitação, por um período de uma hora, para favorecer a expressão da marca de seleção nas células de

E.coli transformadas. Após esse período, fez-se uma rápida centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de bactéria foi ressuspenso, com o auxílio de uma pipeta de 200 µL, no pequeno volume de sobrenadante que restou no tubo após a centrifugação. O volume final contendo as células de *E. coli* foi dividido em dois volumes diferentes, onde um volume continha aproximadamente 90% do total e o outro contendo os outros 10% restante. Esses volumes foram plaqueados em duas placas contendo meio LB acrescido de ampicilina (50 mg/mL) e contendo 40 µL de X-Gal (40mg/mL) e 40 µL de IPTG (isopropiltiogalactosídeo) na concentração de 100 mM. , as quais foram então incubadas em estufa bacteriológica, a 37° C, por 18 horas. Algumas colônias brancas foram então selecionadas e cultivadas a 37° C em meio líquido LB acrescido de ampicilina (50 mg/mL), num volume de aproximadamente 6 mL, por um período de 8 horas e sob agitação constante de 250 rpm. Após este período de crescimento procedeu-se à extração de plasmídios pelo método da lise alcalina. O protocolo utilizado para extração plasmidial por lise alcalina está descrito em Sambrook *et al.* (1989). O DNA plasmidial foi então submetido ao seqüenciamento no seqüenciador ABI3700, como já descrito anteriormente, com a finalidade de confirmar a inserção do gene *gus* no vetor e sua orientação. Utilizou-se para o seqüenciamento os primers PUC “forward” e PUC “reverse”.

O vetor pBGUS destina-se a receber insertos correspondentes às seqüências promotoras contendo elementos “PIP box” a serem testados. O promotor contendo o consenso “PIP box” sob teste estará posicionado imediatamente a 5’ do gene *gus* (“upstream”), de modo a dirigir a expressão deste, caso se trate de um promotor “PIP box” funcional.

Anteriormente às construções propriamente ditas, as seqüências promotoras contendo “PIP box” a serem testadas, bem como a seqüência do gene *gus*, foram

submetidas a análise através do programa computacional “Webcutter” (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>), gerando os mapas de restrição para cada sequência de interesse. Os resultados obtidos nos mapas de restrição, aliados às informações dos sítios múltiplos de clonagens nos vetores a serem utilizados, deram suporte para que as clonagens pudessem ser realizadas com sucesso.

4.16.1.2 Desenho de Oligonucleotídeos e Construções no pBGUS

O desenho dos oligonucleotídeos foi destinado a amplificar as seqüências promotoras (com “PIP box”) de dois genes que foram testados nos ensaios de expressão de gene repórter, sendo eles: XAC0416 e XAC0424. Os oligonucleotídeos foram desenhados de modo a conterem sítios para enzimas de restrição, facilitando assim a clonagem no vetor pBGUS (digerido com a mesma combinação de enzimas). Estas clonagens resultaram nos vetores pBGUS0416 e pBGUS0424.

A partir de um banco de dados do genoma da *Xac* (não público), foram recuperadas seqüências de aproximadamente 500 bases a 5’ (“upstream”) da metionina inicial dos dois genes cujos promotores foram testados. Estas seqüências foram utilizadas para desenhar os dois pares de oligonucleotídeos com o programa Gene Runner, como mostrado abaixo para os genes XAC0416 e XAC0424 (**Figuras 11 e 12**).

A partir da região promotora do gene XAC0416 (499 nucleotídeos acima da metionina inicial) contendo a seqüência “PIP box”, foram desenhados os oligonucleotídeos XAC0416_F e XAC0416_R contendo os sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI (**Figura 11 B**). Na **Figura 11 A** pode-se notar em destaque a seqüência “PIP box” (azul e preto em negrito), que está a 135 pb do início da região codificadora do gene.

A)

atgacgattcctctctgattaactgggatttgtttttcgctcaactgccgggcgtaagcgacgg
 cagttgtggggcgcggtttttcgccccgaatgaacagtagaagcggcagcccggtatcgccagaa
 atttt**gcgaaattgcgcttgtacggg**gcgaa gaaggccagtgaaaaatgttttgggatcgataag
 aaaatccccggggcgcggtgattgaaggacgttttttcgcttgctgctaagtgtttcgtcggccct
 gagtaaatcacgtacaggtggcggttatggtgccgcgctcgagcgttgtgggtgggtgcgtgccg
 gcgctctactcacctggagacctgtattcaatcgagatcgaggtaacggcaaataagcgattca
 acgatcgcggtaccagcatgtcgatcagcactccaatttgcagttgggggttctcgtccgggcctt
 cgccaaaacgacgcgtgcgcgcgaaaagggtcag**gatgtggtcgtcgggcag**

B)

XAC0416_F (*Bam*H1) 5'-Cgggg**ATCCAT**gACgATTCCTCTCTgA-3'

XAC0416_R 3'-CTACACCAgCAGCCCGTCCTTA**Ag**AAT-5' (*Eco*RI)

Figura 11. Desenho de oligonucleotídeos para clonagem do promotor “PIP box” candidato do gene XAC0416. **A)** Sequência de 499 nucleotídeos a 5' do ATG inicial do gene XAC0416. As regiões de hibridação dos oligos XAC0416_F e XAC0416_R estão em vermelho na Figura e a sequência “PIP box” encontra-se em negrito, com as bases em azul representando o consenso do “PIP box” e as bases em preto correspondendo à região variável do elemento PIP. **B)** Sequência dos oligos desenhados para a amplificação e clonagem da região promotora incluindo o “PIP box”. Os sítios de restrição em cada oligonucleotídeo estão em negrito e entre parênteses a endonuclease correspondente ao sítio de restrição.

A partir da região promotora do gene XAC0424 (500 nucleotídeos acima da metionina inicial) contendo a sequência “PIP box”, foram desenhados os oligonucleotídeos XAC0424_F e XAC0424_R contendo os sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI (**Figura 12 B**). Na **Figura 12 A** pode-se notar em destaque a sequência “PIP box” (azul e preto em negrito), que está a 109 pb do início da região codificadora do gene.

A)

gcgccaggggtctc**gagag**gtcttgtgctaacgctcgatatcggcgcgagcaggggcgcttgag
 caagccggggccatagcgcgcaccgacgacctgcaggccagtggcg**aagcacggtcgcgataaac**
gaagcgagacgtcgatgaaccggttagccagatgagggcgagcgcagccgaacgctcccgtatt
 cgggtgcatgtcacggcccacgcaccgatacggggatgtcatcgcaactgcaatgtggcacttatg
 ccttgccgcatgcgcaactgtgcgtaaaggaatgtgggctgtcgcagaaaagtcagcacgtggt
 cacgcatattttatttggtcggggtgtagattcctctgcaagggcgacgtggagtagcgcgta
 gccacgctcctcactcgtagcaagtcgtctggctgaatcggcagacggcgggttttcgcttcgc
 cgttttttccgtctccacccacattacgacggac**gtttagatgggttgccatg**

B)

XAC0424_F (BamHI) 5'-AA**AggATCC**gCgCCAgggTCTCgAgAg-3'

XAC0424_R 3'-CAAATCTACCAACggTAC**CTTA**gAgC-5' (EcoRI)

Figura 12. Desenho de oligonucleotídeos para clonagem do promotor “PIP box” candidato do gene XAC0424. A) Sequência de 500 nucleotídeos a 5' do ATG inicial do gene XAC0424. As regiões de hibridização dos oligos XAC0424_F e XAC0424_R estão em vermelho na Figura e a sequência “PIP box” encontra-se em negrito, com as bases em azul representando o consenso do “PIP box” e as bases em preto correspondendo à região variável do elemento PIP. B) Sequência dos oligos desenhados para a amplificação e clonagem da região promotora incluindo o “PIP box”. Os sítios de restrição em cada oligonucleotídeo estão em negrito e entre parênteses a endonuclease correspondente ao sítio de restrição.

As reações de PCR para obter as seqüências de interesse foram realizadas a partir de DNA genômico da *Xac*. A reação de PCR foi feita usando 1/10 de volume do tampão da enzima, 0,2 mM do mix de dNTPs (A, T, C, G), 2 mM de MgCl₂, 0,4 pmoles de cada oligonucleotídeo, 0,2 U de Taq HiFi (“Taq DNA Polymerase High Fidelity”, Invitrogen) e 100 ng de DNA genômico. Os ciclos de PCR utilizados foram: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 45 segundos de temperatura de anelamento (a temperatura foi adequada para cada oligonucleotídeo iniciador), 72°C de extensão por 30 segundos (recomenda-se 1 minuto para cada 1 Kb de fragmento amplificado), e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

A análise do produto das reações de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%, e coloração do gel com brometo de etídeo. Os fragmentos resultantes das amplificações foram purificados do gel utilizando o produto “S.N.A.P.TM gel purification kit” (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os fragmentos purificados, correspondentes às seqüências “PIP box”, foram ligados no vetor pBGUS usando a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) resultando nos vetores pBGUS0416 e pBGUS0424. Estes vetores foram posteriormente utilizados para clonagem das seqüências “PIP box”-GUS no vetor pHM1, que possui origem de replicação tanto em *E. coli* como em *Xanthomonas*

4.16.2 Construções no Vetor pHM1

As construções pBGUS0416 e pBGUS0424 (4,8 Kb cada) foram digeridas com as enzimas *Hind*III e *Sac*I capazes de liberar do vetor pBSKII os fragmentos contendo as respectivas regiões promotoras (aproximadamente 500pb) e o gene *gus* (1,8 Kb). No caso do pBGUS (controle negativo), essas mesmas enzimas liberam o fragmento de 1,8 Kb correspondente ao gene *gus*. Tendo em vista que o gene *gus* está clonado nos sítios *Bam*HI e *Sac*I e as seqüências promotoras foram clonadas nos sítios *Eco*RI e *Bam*HI, as endonucleases *Hind*III e *Sac*I são capazes de liberar as seqüências de interesse, como podemos observar na **Figura 13**.

pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 598–826)

Figura 13. Esquema geral mostrando os sítios múltiplos de clonagem no vetor pBSKII, no qual está clonado o gene *gus*. As estrelas indicam os sítios de enzimas utilizados no presente trabalho.

A reação de digestão dos vetores pBGUS0416, pBGUS0424 e pBGUS foi composta de tampão comum para as enzimas *HindIII* e *SacI* na concentração de 1X em relação ao volume final, cinco unidades de cada enzima (New England Biolabs), 3,0 ug de DNA de cada vetor e água Milli-Q autoclavada, com a reação sendo incubada de acordo com as instruções do fabricante das enzimas. Após a digestão os plasmídeos foram visualizados em gel de agarose 0,8%. Os fragmentos de interesse (seqüência promotora + seqüência do gene *gus* ou somente a seqüência do gene *gus*) foram eluídos do gel de agarose e purificados pelo kit “S.N.A.P.TM gel purification kit”, (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. Os fragmentos purificados foram utilizados para a reação de ligação com o vetor pHM1 (aproximadamente 13,3 Kb), que possui origem de replicação em *Xanthomonas*. Antecedendo à ligação, o vetor pHM1 também foi digerido com as mesmas endonucleases, *HindIII* e *SacI* (**Figura 14**), utilizadas na digestão enzimática de pBGUS0416, pBGUS0424 e pBGUS.

O vetor pHM1 possui origem de replicação em *Xanthomonas* e contém marca de seleção ao antibiótico espectinomicina ou estreptomicina (**Figura 14**).

Figura 14. Mapa físico do vetor pHM1. Sítios únicos estão apresentados em vermelho.

A reação de digestão do vetor pHM1 foi realizada seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente para os vetores pBGUS0416, pBGUS0424 e pBGUS.

A reação de ligação dos fragmentos de interesse purificados (que contém a sequência promotora do tipo “PIP box” dos genes XAC0416 ou XAC0424 + gene *gus* ou, apenas a o gene *gus* no caso do controle negativo) com o vetor plasmidial pHM1 foi realizada utilizando-se 3 µL do vetor pHM1, 8 µL do inserto purificado, 10% do volume final do tampão da ligase (10x), 1U da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs), e o volume final foi ajustado para 15 µL. A reação foi mantida a 15° C, por um período de 16 horas.

As construções resultantes no vetor pHM1, após as ligações, foram denominadas pHMGUS0416 (15,6 Kb), pHMGUS0424 (15,6 Kb) e pHMGUS (controle negativo, 15,1 Kb). Estas construções foram eletroporadas em células competentes de *E. coli* DH10B conforme já descrito anteriormente. O DNA plasmidial de colônias de *E. coli* transformadas foi extraído e digerido com as endonucleases *HindIII* e *SacI* para averiguar se os mesmos continham a construção desejada. A digestão enzimática foi realizada utilizando um volume final de 15 µL, contendo tampão comum para as enzimas *HindIII* e *SacI* na concentração de 1X, 5 U de cada enzima (New England Biolabs), 5 µL de plasmídeo e água Milli-Q estéril. A reação enzimática foi incubada de acordo com as instruções do fabricante. Após a digestão os plasmídeos foram visualizados em gel de agarose 0,8% e aqueles que mostraram liberação do fragmento de interesse foram utilizados para eletroporar células competentes de *Xac*. Para estas eletroporações foram utilizados 2 µL do plasmídeo pHM1 e 40 µL de células eletrocompetentes de *Xac*. Essa mistura foi submetida ao eletroporador Gene Pulser II (Biorad) nas seguintes condições: 2,5 KV; 200 r Low Range e 25 µF Low cap. Em seguida foi adicionado 980 µL de SOB (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl₂ e 10mM MgSO₄); 10 µL de Mg⁺⁺ e 10 µL de glicose 2M e a mistura foi então incubada a 28°C sob agitação, por um período de uma hora, para favorecer a expressão da marca de seleção nas células de *Xac* transformadas. Após esse período, alíquotas de 80 µL e 200 µL das células de *Xac* eletroporadas foram plaqueadas em meio NA (Nutriente ágar) acrescido de espectinomicina (50 mg/mL). Algumas colônias de *Xac* transformadas foram selecionadas para todas as construções de interesse, ou seja, *Xac* contendo os plasmídeos pHMGUS0416, pHMGUS0424 e pHMGUS.

Estes clones de *Xac* foram utilizados para os experimentos “in vitro” e “in vivo” de gene repórter.

4.16.3 Ensaio de Atividade de GUS em Células de *Xac* Transformadas

4.16.3.1 Ensaio Enzimático

Para os ensaios de atividade da β -glucuronidase (GUS) foi utilizado o ensaio enzimático descrito por Lacorte (1998). O ensaio enzimático é baseado na clivagem do substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo (X-gluc) pela β -glucuronidase. O produto dessa reação, na presença de oxigênio, forma dímeros, resultando em um precipitado insolúvel de cor azul.

Para os ensaios enzimáticos, células de *Xac* selvagem ou das bactérias transformadas contendo as construções repórter (pHMGUS0416, pHMGUS0424, pHMGUS) foram cultivadas nos meios XAM1 (mimetiza o espaço apoplástico do vegetal) e CN (meio rico) por 20 horas. Suspensões bacterianas das *Xacs*, selvagem e transformadas, cultivadas em meio CN e contendo 10^8 UFC/mL em 1mM de $MgCl_2$ foram utilizadas para realizar as inoculações em folhas de laranjeiras. Após 3 e 5 dias de inoculação as células bacterianas foram exsudadas do tecido vegetal em solução aquosa contendo 1mM de $MgCl_2$. Os respectivos exsudados foram centrifugados e ao “pellet” bacteriano foi adicionado solução de 1mM de $MgCl_2$ até obter uma densidade óptica (DO) de 0,3 a 600 nm. Da mesma forma, após 20 horas de cultivo das células de *Xac* (selvagem ou transformada) nos meios XAM1 e CN, as respectivas suspensões bacterianas foram centrifugadas, seguido de ajuste da DO_{600} para 0,3. Tendo todas as suspensões bacterianas na mesma DO_{600} , alíquotas de 100 μ L foram adicionadas a tubos “ependorf” de 1,5 mL e utilizadas para os ensaios enzimáticos, sendo o ensaio

realizado em triplicata. As referidas alíquotas foram centrifugadas e ao “pellet” bacteriano foram adicionados 300 μ L de tampão de reação do substrato X-gluc (100 mM de NaH₂PO₄.H₂O; 0,5 mM de K₄Fe(CN)₆.3H₂O; 10 mM de Na₂EDTA.2H₂O; 0,1% de Triton[®]X-100) contendo o substrato X-gluc (50 mg/mL). O “pellet” bacteriano foi ressuspensionado no tampão através de pipetagens, sendo que o tampão lisa as bactérias. Um outro conjunto de experimentos em triplicata, nas mesmas condições relatadas acima para obter as suspensões bacterianas com DO₆₀₀ de 0,3, foram realizados concomitantemente, no entanto, ao “pellet” bacteriano foi adicionado tampão sem o substrato X-gluc. Todos os tubos contendo o ensaio enzimático foram mantidos no escuro a uma temperatura de 30°C. O desenvolvimento do ensaio experimental foi monitorado observando periodicamente a mudança de coloração ao longo de 2 horas. Após 30, 60 ou 120 minutos os tubos foram centrifugados por 3 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio de vidro de 3 mL, os quais foram então fotografados e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada a 600nm utilizando brancos adequados.

4.16.3.2 Determinação Espectrofotométrica

Como mencionado acima, a cor azul produzida pela ação da β -glucuronidase sobre o substrato cromogênico X-gluc teve sua absorbância a 600nm determinada em espectrofotômetro. Todas as amostras (triplicata) de *Xac* + tampão do X-gluc ou *Xac* + tampão do X-gluc + X-gluc tiveram sua absorbância a DO₆₀₀ determinada. Os valores de absorbância obtidos nos ensaios contendo as células bacterianas e o tampão do X-gluc foram subtraídos dos valores obtidos nos ensaios contendo as respectivas células

bacterianas e o tampão do X-gluc mais o X-gluc (substrato). Cabe ressaltar que o aparelho foi zerado com o tampão do substrato X-gluc.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Mapeamento “in silico” dos Genes Contendo Promotor “PIP box”

A busca por possíveis “PIP box” no genoma da bactéria *X. axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), para o consenso com intervalo de 15 nucleotídeos, gerou 95 e 82 genes nos consensos 5'-TTCGN...N15...TTCGN-3' e 5'-NCGAA...N15...NCGAA-3', respectivamente. Para o intervalo de 16 nucleotídeos os consensos 5'-GCGAA...N16...GCGAA-3' e 5'-TTCGC...N16...TTCGC-3' geraram 14 e 17 genes, respectivamente, onde N pode ser qualquer um dos quatro nucleotídeos. Esta análise resultou um total de 208 clones associados a genes cuja expressão possa ser regulada em *cis* por este elemento, os quais foram categorizados de acordo com a classificação adotada no genoma da *Xac* (**Figura 15 e Tabela 1**). Desta forma, genes contendo seqüências “PIP box” na região 5' não traduzida da ORF ou internamente na região codificadora, foram selecionados para avaliação do perfil de expressão em sistemas de indução “in vivo” ou “in vitro” da patogenicidade e virulência do fitopatógeno.

Figura 15. Categorização dos 208 genes contendo “PIP box” de *Xac* identificados “in silico” e utilizados no presente estudo.

Uma vez categorizados, pudemos observar que parte dos genes que possuem possíveis “PIP box” funcionais pertencem a categoria de patogenicidade, virulência e adaptação, como é o caso de alguns genes associados a fenômenos de avirulência, de patogenicidade e resposta de hipersensibilidade, e genes de degradação da parede celular. Além desses genes com similaridade a genes de patogenicidade presentes em outros patógenos, também foram encontrados genes que não possuem função definida até o momento (genes hipotéticos), o que os coloca na posição de candidatos a novos genes de virulência ainda não descritos.

Tabela 1. Identificação dos 208 genes possivelmente controlados por promotores “PIP box” e seus respectivos clones.

gi*	Identidade do gene**	Proteína deduzida	Categoria do gene**	Identidade do clone
gi 2122952	XAC0075	proteína semelhante a repressor de xilose	I	A0JJ0702C08
gi 2122972	XAC0266	reguladora de transcrição da família acrR	I	A0QR5408D08
gi 2122977	XAC0307	hidrolase de nucleosídeos	I	A0QR6102G07
gi 2122983	XAC0360	glicerol-3-fosfato desidrogenase	I	A0JE1211B06
gi 2983155	XAC1171	quinase serina/treonina	I	A0QH6731G10
gi 1596398	XAC1298	reguladora de transcrição	I	A0CE9839F02
gi 2123071	XAC1309	arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidase	I	A0CE6745D07
gi 2123094	XAC1535	oxoglutarato desidrogenase	I	A0JJ1179G08
gi 2123122	XAC1797	proteína regulatória do sistema de 2 componentes	I	A0UV9900G11
gi 2123122	XAC1798	proteína sensora do sistema de 2 componentes	I	A0QR6002G04
gi 2123125	XAC1825	reguladora da redução de fumarato e nitrato	I	A0JE1211G05
gi 2123131	XAC1886	hidrolase da beta-cetoadipato enol-lactona	I	A0QR5204A03
gi 2123135	XAC1938	proteína da família GGDEF	I	A0UV6736A05
gi 2123158	XAC2068	6-fosfogluconato desidratase	I	A0JJ1389E04
gi 2123158	XAC2069	6-fosfogluconolactonase	I	A0JJ1546A01
gi 2123158	XAC2070	quinase de glucose	I	A0QR6490H11
gi 2123177	XAC2469	succinato-semialdeído desidrogenase	I	A0QH6732C06
gi 2123211	XAC2849	nitrilase	I	A0QR6001E10
gi 2500791	XAC2972	fator sigma 54 da RNA polimerase	I	A0UV6739G09
gi 2123230	XAC3060	proteína H que cliva glicina	I	A0UV6761B08
gi 2123230	XAC3061	proteína T que cliva glicina	I	A0QH6731C01
gi 2123231	XAC3072	alfa-L-fucosidase	I	A0UE9889B03
gi 2123253	XAC3254	enzima desramificadora de glicogênio	I	A0AC6824D06
gi 2123259	XAC3313	alfa-glucosidase	I	A0QH6811A04
gi 1409041	XAC3608	maleilacetoacetato isomerase	I	A0CE6507D01
gi 2123006	XAC3609	fumarilacetoacetato hidrolase	I	A0UE6611H05
gi 2123320	XAC3833	proteína regulatória da β -lactamase	I	A0UV9819D07
gi 2123321	XAC3835	isocitrate desidrogenase	I	A0QR6001F10
gi 2123324	XAC3869	beta-glucosidase	I	A0JE1079C03
gi 2123326	XAC3887	subunidade I da citocromo C oxidase	I	A0UV9905F01
gi 1612479	XAC4132	ácido fosfatase/6-fitase	I	A0QR6418H01
gi 2123345	XAC4156	proteína FldA	I	A0UV9880G11
gi 2123345	XAC4157	4-oxalomesaconato hidratase	I	A0QR6804D05
gi 2123349	XAC4193	proteína sensora do sistema de 2 componentes	I	A0QR5704D01
gi 2296343	XAC4327	uréia amidolise	I	A0JE1321A12
gi 2122982	XAC0345	ácido dihidroxi desidratase	II	A0EC6472A01
gi 2122993	XAC0476	componente I da antranilato sintase	II	A0QH6810D05
gi 2123302	XAC0548	precursora de gluconolactonase	II	A0UV6711C07
gi 2123088	XAC1467	proteína da biossíntese de molibdopterina	II	A0CE6742E05
gi 2123104	XAC1650	3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferase	II	A0QR6460C03

Continua

Continuação

gi*	Identidade do gene**	Proteína deduzida	Categoria do gene**	Identidade do clone
gi 21231257	XAC1829	histidinol desidrogenase	II	A0JE5637G06
gi 22095491	XAC1862	cadeia pesada da carbamoil-fosfato sintase	II	A0UV6434C03
gi 21231684	XAC2349	acetilornitina deacetilase	II	A0UV6458G12
gi 21231685	XAC2351	argininosuccinato sintase	II	A0CE5420D02
gi 21231695	XAC2360	dihidroorotase	II	A0UV6763E08
gi 21231794	XAC2489	omega-amino ácido-piruvato aminotransferase	II	A0JE5637G08
gi 21231823	XAC2521	uracil fosforibosiltransferase	II	A0UV6709H06
gi 21232271	XAC3009	piridoxamina 5'-fosfato oxidase	II	A0UV6486C09
gi 21232748	XAC3447	proteína da biossíntese de tiamina	II	A0QR6841A08
gi 21230156	XAC3521	nicotinato fosforibosiltransferase	II	A0QR6437A01
gi 21233375	XAC4034	shikimato 5-dehidrogenase	II	A0QR5510H06
gi 21233407	XAC4074	cadeia β da ribonucleosídeo-difosfato redutase	II	A0CE6745C01
gi 21233423	XAC4089	halogenase	II	A0UE6463C09
gi 21233425	XAC4090	3-oxoacil-[ACP] redutase	II	A0UV6709A12
gi 21326649	XAC0001	DnaA iniciadora da replicação cromossomal	III	A0CE9727E02
gi 21230334	XAC0937	ribonuclease BN	III	A0UV6766B12
gi 23822135	XAC1329	RNA metiltransferase	III	A0QR5902A01
gi 21230786	XAC1375	ciclopropano ácido graxo fosfolipídeo sintase	III	A0QR9864B03
gi 21230796	XAC1386	metionil-tRNA sintetase	III	A0JE1211H05
gi 21230876	XAC1463	fosfolipase	III	A0UV6708D05
gi 21107689	XAC1511	tmRNA	III	A0UV9901D05
gi 21231021	XAC1623	proteína relacionada a segregação de cromossomo	III	A0UV6762E05
gi 21231532	XAC2111	ribonuclease E	III	A0QR5529F03
gi 21231696	XAC2361	peptidase	III	A0JE1208H07
gi 21231816	XAC2514	S-adenosilmetionina:tRNA ribosiltransferase-isomerase	III	A0QR5407F08
gi 21231830	XAC2528	proteína de choque térmico (Hsp90)	III	A0QR6304D02
gi 21231900	XAC2596	ciclomaltodextrin glucanotransferase (CGTase)	III	A0UV6487F02
gi 21108901	XAC2624	tRNA:val	III	A0UT6817F09
gi 5870855	XAC2625	subunidade B da excinuclease ABC	III	A0UV5503H06
gi 21232071	XAC2811	pseudouridilato sintase	III	A0QR6202H02
gi 21232129	XAC2858	fator de reparo de transcrição	III	A0JE1637F04
gi 21232586	XAC3309	aminopeptidase	III	A0UE6759C02
gi 21230200	XAC0780	UDP-N-acetilmuramato-alanine ligase	IV	A0QH6308G12
gi 21230201	XAC0781	D-alanina--D-alanina ligase B	IV	A0UT9849E08
gi 21230404	XAC1012	proteína de membrana externa	IV	A0QH6306C05
gi 21233422	XAC4088	proteína associada a dolcil-fosfato mannose sintase	IV	A0UV6349B06
gi 21231930	XAC2672	proteína Oar (receptor dependente de TonB)	IV	A0QR6613G03
gi 21229780	XAC0317	transportador MFS da família YNFM	V	A0UV6711G02
gi 26250675	XAC0337	permease de 2-ceto-3-deoxi-D-gluconato	V	A0UV5524F12
gi 21230208	XAC0788	proteína translocase da subunidade SecA	V	A0UE6718F01
gi 21230581	XAC1224	fator de especificidade de divisão celular topológica	V	A0UV6765C04
gi 21230582	XAC1225	proteína determinante do sítio de septação	V	A0UV6735A11

Continua

Continuação

gi*	Identidade do gene**	Proteína deduzida	Categoria do gene**	Identidade do clone
gi 2123063	XAC1276	receptor dependente de TonB	V	A0JJ1536G05
gi 2123071	XAC1310	receptor dependente de TonB	V	A0UT6817F08
gi 2123084	XAC1435	receptor de ferro dependente de TonB	V	A0UE6610E07
gi 2346926	XAC1801	proteína transportadora de Prop	V	A0QR6705C01
gi 2123127	XAC1842	transportadora de amino ácido catiônico	V	A0CE9840B04
gi 6969593	XAC1935	proteína relacionada com a biogênese de flagelo	V	A0QR5317G10
gi 2347298	XAC3474	proteína carregadora de citrato	V	A0UV6819G10
gi 2299175	XAC3600	proteína ligante ao ATP do complexo transportador ABC	V	A0UV6509G04
gi 3249313	XAC3601	permease do complexo transportador ABC	V	A0QR6727G10
gi 2123309	XAC3701	antiporter Na ⁺ :H ⁺	V	A0UV6514C09
gi 2123184	XAC2542	permease de aminoácido	V	A0QR5107F06
gi 2123190	XAC2597	proteína transportadora	V	A0QR9771H10
gi 1543079	XAC2971	proteína ligante de ATP de transportador ABC	V	A0EC6316F05
gi 2123247	XAC3171	antiporter cátion:próton	V	A0AC6824F11
gi 2347138	XAC3201	receptor dependente de TonB	V	A0CE6743E01
gi 2123264	XAC3370	receptora de ferro da membrana externa	V	A0AC6823C04
gi 2123354	XAC4257	proteína transportadora	V	A0QR9759G01
gi 2123357	XAC4292	transportadora de benzoato	V	A0QH6380B03
gi 2123091	XAC1510	integrase relacionada ao fago	VI	A0QH6835H03
gi 4206159	XAC0076	proteína semelhante a de avirulência	VII	A0QR6804H12
gi 2123108	XAC0286	proteína semelhante a de avirulência	VII	A0JJ1085D10
gi 3052491	XAC0393	HpaF	VII	A0EC1093D06
gi 3052490	XAC0398	HrpD6	VII	A0AC0113A01
gi 3052490	XAC0399	HrpD5	VII	A0UV6736E03
gi 3052490	XAC0400	HpaA	VII	A0JJ1016G09
gi 5679187	XAC0403	HrcQ	VII	A0CE9842G03
gi 5679186	XAC0404	HpaP	VII	A0QR6451A06
gi 3052490	XAC0405	HrcV	VII	A0CE6342H06
gi 3052490	XAC0406	HrcU	VII	A0QR6839E11
gi 7350918	XAC0407	HrpB1	VII	A0QR6002G09
gi 7350917	XAC0408	HrpB2	VII	A0UV6818E12
gi 3052489	XAC0409	HrcJ	VII	A0QH6731F10
gi 3052488	XAC0416	Hpa1	VII	A0UV6845E05
gi 3052488	XAC0417	Hpa2	VII	A0CE6747A02
gi 2123304	XAC0569	VirP	VII	A0UV6844D04
gi 3330140	XAC0618	proteína da biossíntese de glucano periplasmático	VII	A0QR9767D08
gi 3330140	XAC0661	endopoligalacturonase	VII	A0CE6745H05
gi 2123093	XAC1527	proteína do sistema de efluxo RND	VII	A0UV6485H08
gi 2123093	XAC1528	proteína ligante ao ATP do complexo transportador ABC	VII	A0QR9705B06
gi 2298689	XAC1816	proteína relacionada a hemaglutinina/hemolisina	VII	A0CE6744F03
gi 2123170	XAC2374	poligalacturonase	VII	A0QR5904E12
gi 2123181	XAC2513	queuosine tRNA ribosiltransferase	VII	A0UV6709C04

Continua

Continuação

gi*	Identidade do gene**	Proteína deduzida	Categoria do gene**	Identidade do clone
gi 2123191	XAC2623	VirD4	VII	A0QR6204E07
gi 2123234	XAC3091	proteína relacionada a homeostase do cobre	VII	A0QR6390D06
gi 2123010	XAC3580	fosfomanose isomerase/GDP-manose pirofosforilase	VII	A0UV6739H01
gi 2298006	XAC4113	YapH	VII	A0QH6713D10
gi 2310217	XAC4114	proteína ativadora de hemolisina	VII	A0CE6741D12
gi 2123352	XAC4231	glucano 1,4-beta-glicosidase	VII	A0JJ0707A01
gi 2123354	XAC4258	xilosidase/arabinosidase	VII	A0UV6711G11
gi 2123362	XAC4340	proteína de tolerância ao tolueno	VII	A0QR6106E12
gi 2123362	XAC4341	proteína de tolerância ao tolueno	VII	A0QR6603E02
gi 2122972	XAC0267	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR6375D12
gi 2122973	XAC0277	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0UT9801H10
gi 2122975	XAC0297	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6455E01
gi 2122975	XAC0298	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR5518B07
gi 2122976	XAC0299	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR5703A07
gi 2383128	XAC0315	proteína hipotética	VIII	A0UV9712G03
gi 1867779	XAC0418	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0QR5902F03
gi 2122988	XAC0424	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6739C11
gi 2299743	XAC0501	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6735E05
gi 2123296	XAC0597	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR6841H05
gi 2123287	XAC0677	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0UV6733G02
gi 2123287	XAC0678	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6821H03
gi 2123286	XAC0679	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6761C11
gi 2123022	XAC0805	proteína hipotética conservada	VIII	A0UE6612C04
gi 2123031	XAC0910	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6708B01
gi 2123040	XAC1013	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR5701F12
gi 2123041	XAC1021	proteína hipotética conservada	VIII	A0CE6747B06
gi 2123046	XAC1117	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR5201B12
gi 1722753	XAC1118	proteína hipotética conservada	VIII	A0QH6811C05
gi 2123051	XAC1162	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0QR6840D11
gi 2123051	XAC1163	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0UV6736E11
gi 2123053	XAC1172	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0QR6839G09
gi 2123070	XAC1208	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0QR5903B01
gi 2123058	XAC1223	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR6753B06
gi 2123066	XAC1296	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR9732G07
gi 2123073	XAC1330	proteína hipotética conservada	VIII	A0UT6815B05
gi 2123078	XAC1376	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR9759D12
gi 2123080	XAC1396	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0CE6341D04
gi 2965338	XAC1508	proteína hipotética	VIII	A0QR5108G09
gi 2123094	XAC1536	proteína hipotética conservada	VIII	A0UE6464E07
gi 2110774	XAC1563	proteína hipotética	VIII	A0UV6762H11
gi 2110774	XAC1566	proteína hipotética	VIII	A0UV6762H01
gi 2123113	XAC1706	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6733A02

Continua

Continuação

gi*	Identidade do gene**	Proteína deduzida	Categoria do gene**	Identidade do clone
gi 1831087	XAC1817	proteína hipotética	VIII	A0QR6803D12
gi 2123153	XAC2114	proteína hipotética conservada	VIII	A0CE6505F06
gi 2123085	XAC2190	proteína hipotética conservada	VIII	A0QH6308F06
gi 1815093	XAC2260	proteína hipotética	VIII	A0UE9716H10
gi 2123162	XAC2290	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6762A10
gi 2123238	XAC2350	proteína hipotética conservada	VIII	A0QH6836D12
gi 2310044	XAC2370	proteína hipotética conservada	VIII	A0UE6718H10
gi 2737703	XAC2444	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6712A10
gi 2123179	XAC2490	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0QR5902C08
gi 2123183	XAC2534	proteína hipotética conservada	VIII	A0CE6745C12
gi 2123198	XAC2727	proteína hipotética conservada	VIII	A0QH6810A11
gi 2122970	XAC2786	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0QR5902G02
gi 2297012	XAC2810	proteína hipotética conservada	VIII	A0CE6314F11
gi 2123208	XAC2827	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR6804A08
gi 2123208	XAC2828	proteína hipotética conservada	VIII	A0JE1129A05
gi 2123211	XAC2848	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0UV6819E04
gi 1560381	XAC2902	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6209D03
gi 2123233	XAC3085	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0EC1095B04
gi 2123251	XAC3210	proteína hipotética conservada	VIII	A0AC6824F05
gi 2917149	XAC3230	proteína hipotética	VIII	A0UV6844D03
gi 2123274	XAC3446	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0EC1468G03
gi 2298610	XAC3520	proteína hipotética	VIII	A0QR5407B05
gi 1754488	XAC3596	proteína hipotética	VIII	A0CE6745G03
gi 2123307	XAC3690	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0UV5524G04
gi 2123314	XAC3758	proteína hipotética conservada	VIII	A0UT9701D08
gi 2111023	XAC3834	proteína hipotética	VIII	A0QR6204F01
gi 3863771	XAC3933	proteína hipotética conservada	VIII	A0CE9726D08
gi 3119843	XAC3946	proteína hipotética	VIII	A0UE6757F04
gi 2123337	XAC4033	proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	VIII	A0CE6740D02
gi 3455706	XAC4091	proteína hipotética	VIII	A0CE9723A11
gi 2983374	XAC4133	proteína hipotética conservada	VIII	A0CE6743E02
gi 3204323	XAC4142	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6710D09
gi 3204322	XAC4143	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR5205G12
gi 1559528	XAC4146	proteína hipotética conservada	VIII	A0QR5702C01
gi 1559528	XAC4147	proteína hipotética conservada	VIII	A0UV6735E04
gi 1169311	XAC4203	proteína hipotética conservada	VIII	A0QH6732C02
gi 2123352	XAC4223	proteína hipotética conservada	VIII	A0QH6713H07
gi 2123363	XAC4355	proteína hipotética conservada	VIII	A0QH6215B04
gi 2123067	XAC2922	HrpW	IX	A0QR6725E05
gi 2123360	XAC3090	proteína rica em leucina	IX	A0UV9880B11
gi 2123306	XAC3677	proteína hipotética conservada	IX	A0AC6431A04
gi 2123363	XAC4349	proteína bifuncional: oxiredutase/alginato liase	IX	A0QR6805B06

*Como descrito no GenBank; **De acordo com a anotação do genoma da bactéria *Xac* (<http://www.lbi.ic.unicamp.br>).

5.2 Confeção dos Macroarranjos

Os plasmídeos referentes aos 208 clones que representam os genes mapeados “in silico” foram analisados por eletroforese em gel de agarose (**Figura 16**). A Figura mostra que as extrações resultaram em plasmídeos de alta qualidade (ausência de DNA genômico de *E. coli* e de RNA), apresentando também uma uniformidade da quantidade de DNA plasmidial extraído de cada clone. Estes parâmetros são importantes para uma eficiente reação de sequenciamento de DNA e principalmente, para a confecção do macroarranjo em membrana de náilon.

Para a confirmação da identidade de cada clone, o DNA plasmidial isolado dos 208 clones foi sequenciado e a sequência obtida foi analisada em relação ao Banco de Dados do Projeto de Sequenciamento da *Xac*, utilizando o algoritmo BlastN. Todos os 208 clones tiveram suas identidades confirmadas e o DNA plasmidial contendo as sequências “PIP box” foram então depositadas em membrana de náilon com auxílio do robô Q-bot (Genetix), em duplicata, perfazendo portanto um total de 416 pontos na membrana.

Figura 16. Análise em gel de agarose do DNA plasmidial dos clones representantes de genes contendo promotor do tipo “PIP box”. A concentração do gel é de 0,8% e em cada poço foi aplicado 1 μ L do DNA plasmidial.

5.3 Obtenção de RNA de *Xac* e Síntese das Sondas de cDNAs

Amostras de RNA total (30 µg) extraídas da bactéria *Xac* em estágio não infectante (controle) e em estágio infectante (cultivada por 12 e 20 horas em meio XAM1 indutivo ou exsudada da planta 3 e 5 dias após a inoculação) foram utilizadas na produção de sondas de cDNA, as quais foram então hibridadas contra a membrana de náilon contendo o DNA plasmidial dos 208 clones em duplicata. Cabe aqui salientar que a grande quantidade de folhas inoculadas (240 folhas jovens para exsudação após 3 dias de inoculação e 180 folhas para 5 dias) teve como objetivo a realização de 6 repetições independentes de extração de RNA total.

Os rendimentos, as relações A260/280 nm e a qualidade dos RNAs de uma das extrações estão apresentados, como exemplo, na **Tabela 2** e **Figura 17**, mostrando que as amostras apresentavam-se com bom grau de pureza e com qualidade ideal para os experimentos. Tendo em vista que a absorbância em 260 nm indica presença de ácidos nucleicos, enquanto que A280 nm indica presença de proteínas, RNAs com uma razão A260/A280 nm entre 1,8 e 2,0 são considerados de alta pureza e portanto próprios para utilização experimental (Sambrook *et.al.*, 1989). Os resultados da Tabela 2 indicam que os RNA obtidos se enquadram nessa categoria, pois a relação A260/A280 nm está entre 1,78 e 2,0. No perfil eletroforético (**Figura 17**) foi possível visualizar as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 23S e 16S claramente bem definidas e na proporção esperada, bem como verificar a ausência de DNA genômico. Uma vez verificada a boa qualidade dos RNAs extraídos, os mesmos foram então utilizados para a produção de sondas de cDNA marcadas com [α^{33} P] dCTP, as quais foram utilizadas nas hibridizações das membranas de macroarranjo dos genes de *Xac* contendo os “PIP

box” putativos. A atividade específica das sondas para cada experimento variou de 56% a 79%.

Tabela 2. RNAs obtidos de bactérias cultivadas em meio rico, meio indutivo e exsudadas de folhas de laranjeiras.

Amostra	Relação A260/280 nm	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Rendimento (μg) ¹
Meio Caldo Nutriente	1,88	1,90	190
Meio XAM1 12h	1,78	2,40	240
Meio XAM1 20h	2,00	2,10	210
3 dias após inoculação	1,90	0,55	55
5 dias após inoculação	1,87	0,70	70

¹RNA ressuspensionado em 100 μL

Figura 17. Análise em gel de agarose do RNA total extraído de *Xac*. Foi utilizado gel desnaturante de agarose 1,5% e em cada poço foi aplicado 3 μg de RNA. Colunas 1 a 5 indicam RNAs totais da bactéria, sendo 1) bactéria cultivada por 18 horas em meio Caldo Nutriente; 2) bactéria cultivada por 12 horas em meio XAM1; 3) bactéria cultivada por 20 horas em meio XAM1; 4) bactéria exsudada de folhas de laranjeira aos 3 dias após a inoculação e, 5) bactéria exsudada de folhas de laranjeira aos 5 dias após a inoculação. A posição de migração dos RNAs ribossomais 16S e 23S é mostrada no gel.

5.4 Híbridações das Membranas de Náilon com cDNAs Marcados

As membranas de náilon contendo os 208 genes em duplicata foram hibridadas com sondas de cDNA, conforme descrito nos itens 3.10 até 3.12 de Material e Métodos, e o resultado de uma das híbridações está apresentada na **Figura 18**.

Figura 18. Autorradiografia do macroarranjo contendo genes de *Xac* com “PIP box” putativo. Imagens digitalizadas de membranas de náilon 3x5 cm, contendo 208 clones em duplicata preparadas a partir de DNA plasmidial e hibridadas com sondas produzidas a partir de 30µg de RNA total de bactéria em estágio não infectante (A) e de bactéria em estágio infectante 3 dias após a inoculação (B), marcadas com 3µL (30µCi) de [α^{33} P] dCTP.

A **Figura 18** exemplifica o perfil diferencial de hibridação dos genes de *Xac* quando a bactéria encontra-se em situação não infectante ou infectante. É possível observar que a hibridação não ocorreu em todos os pontos das membranas, bem como a maior ou menor intensidade de sinal, o que demonstra a diferença na expressão desses genes. Cabe ressaltar que para cada condição experimental foram realizadas 6 repetições independentes, além do que cada membrana contém uma repetição técnica, ou seja, cada gene está representado duas vezes na membrana. Portanto, os resultados das

hibridações para cada um dos 208 genes foram analisados estatisticamente a partir de 12 pontos de hibridação.

5.5. Genes Diferencialmente Expressos

5.5.1. Categorização

Após análises estatísticas comparativas entre as membranas hibridadas com sondas representativas da cinética de infecção *Xac*::hospedeiro cítrico *versus* controle (bactéria cultivada em meio Caldo Nutriente), foram identificados 67 genes diferencialmente expressos dentre os 208 inicialmente selecionados para este estudo, ou seja, 32% dos genes associados ao consenso do tipo “PIP box” tiveram sua expressão alterada em função da interação do patógeno com a planta hospedeira ou com o meio que mimetiza o espaço apoplástico vegetal (**Tabela 3**). Estes genes diferencialmente expressos estão distribuídos em oito categorias funcionais (<http://www.lbi.ic.unicamp.br>) do genoma da *Xac* (**Figura 19**).

Tabela 3. Distribuição dos consensos do tipo “PIP box” nos 208 genes mapeados “in silico” e nos 67 genes diferencialmente expressos no macroarranjo.

Tipo de consenso	Número de genes “in silico”	Número de genes diferencialmente expressos no macroarranjo
5’-TTCGn...N15...TTCGCn-3’	95	26
5’-nCGAA...N15...nCGAA-3’	82	31
5’-GCGAA...N16...GCGAA-3’	14	06
5’-TTCGC...N16...TTCGC-3’	17	04
TOTAL	208	67

Figura 19. Categorização dos 67 genes diferencialmente expressos em *Xac* em contato com a planta hospedeira ou com o meio indutivo.

5.5.2 Perfil de Expressão ao Longo da Infecção

A análise da expressão de genes contendo putativos promotores do tipo “PIP box” durante a cinética de infecção do fitopatógeno *Xac* e a planta hospedeira gerou 67 genes diferencialmente expressos. Deste total, 29 genes tiveram sua expressão induzida (“up regulated”) e 38 foram reprimidos (“down regulated”), sendo que um desses genes, a XAC1208, teve um comportamento híbrido, sendo induzido no início da interação bactéria::planta hospedeira e posteriormente foi reprimido (**Tabela 4**). Dentre os genes reprimidos, evidenciados a partir desta análise, pudemos identificar genes relacionados à categoria VII de patogenicidade, virulência e adaptação. Assim como Occhialini *et al* (2005) relataram pela primeira vez no fitopatógeno, *R. solanacearum*, verificamos em

Xac a ocorrência de regulação negativa para genes contendo elementos “PIP box” posicionados na região promotora.

Cabe aqui salientar que todos os genes diferencialmente expressos e que se enquadraram na categoria de codificadores de proteínas hipotéticas, de acordo com a anotação do genoma da *Xac*, tiveram suas respectivas seqüências de aminoácidos novamente submetidas à análise. As respectivas seqüências de aminoácidos das proteínas hipotéticas foram reanalisadas utilizando o algoritmo BlastP contra o centro de dados público NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). Seqüências de aminoácidos homólogas a seqüências de proteínas depositadas e com e-value $< 1 \times 10^{-30}$ foram reanotadas neste trabalho (**Talela 4**). Na tentativa de melhorar a apresentação e entendimento dos resultados obtidos, a Tabela 4 foi construída de maneira a reunir os 67 genes diferencialmente expressos em diferentes grupos, os quais denominamos de classes funcionais.

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos durante a cinética de infecção.

Classe funcional	GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				PRODUTO GÊNICO	CATEGORIA ¹	Consenso PIP	Distância do PIP
		12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.				
A	XAC0398	2,29	3,30	3,52	4,28	HrpD6	VII	nCGAA...N15...nCGA	931
	XAC0399	2,66	4,47	4,03	4,59	HrpD5	VII	nCGAA...N15...nCGA	I
	XAC0416	7,04	7,22	14,02	16,55	Hpa1	VII	nCGAA...N15...nCGA	135
	XAC2922		1,29	2,25	1,28	HrpW	IX	TTCGn...N15...TTCGn	165
	XAC0400			1,06	0,89	HpaA	VII	nCGAA...N15...nCGA	I
	XAC0417				1,98	Hpa2	VII	TTCGn...N15...TTCGn	271
	XAC1208	1,01			-0,55	XopP*	VII	TTCGn...N15...TTCGn	353
	XAC0404				-2,73	HpaP	VII	nCGAA...N15...nCGA	I
B	XAC0360	1,75	2,12	2,81	2,88	glicerol-3-fosfato desidrogenase	I	nCGAA...N15...nCGA	38
	XAC1463	0,98				fosfolipase	III	nCGAA...N15...nCGA	I
	XAC1375		1,10	0,70	0,97	ciclopropano ácido graxo fosfolipídeo sintase	III	nCGAA...N15...nCGA	260
	XAC0618		0,76	0,77	0,89	proteína da biossíntese de glucano periplasmático	VII	TTCGC...N16...TTCGG	I
	XAC2542			1,60	1,62	Permease de aminoácido	V	GCGAA...N16...GCGA	I
	XAC0781		-0,60	-0,98		D-alanina--D-alanina ligase B	IV	TTCGC...N16...TTCGG	799
C	XAC1276	1,57				receptor dependente de TonB	V	TTCGn...N15...TTCGn	I
	XAC1435	0,99	0,47			receptor de ferro dependente de TonB	V	nCGAA...N15...nCGA	271
	XAC2672			0,99		proteína Oar (receptor dependente de TonB)	IV	nCGAA...N15...nCGA	I
	XAC1310			0,77	0,68	receptor dependente de TonB	V	nCGAA...N15...nCGA	I
D	XAC4258	0,94				xilosidase/arabinosidase	VII	TTCGn...N15...TTCGn	943
	XAC3313	0,95				alfa-glucosidase	I	TTCGn...N15...TTCGn	I
E	XAC1797			0,99		proteína reguladora do sistema de 2 componentes	I	nCGAA...N15...nCGA	701
	XAC4193		0,90			proteína sensora do sistema de 2 componentes	I	nCGAA...N15...nCGA	I
F	XAC1935	0,80	2,95	1,75	2,41	proteína associada a biogênese de flagelo	V	nCGAA...N15...nCGA	I
	XAC0424		2,12	2,24	2,05	diguamilato ciclase putativa (domínio GGDEF)*	I	nCGAA...N15...nCGA	107
	XAC1816				-1,57	proteína associada a hemaglutinina/hemolisina	VII	TTCGn...N15...TTCGn	I
G	XAC2111	1,97				ribonuclease E	III	GCGAA...N16...GCGA	I
	XAC1330	-1,26				proteína da família de adenilato ciclase	I	TTCGn...N15...TTCGn	937
	XAC4074	-1,56	-1,72	-1,53	-1,94	cadeia β da ribonucleosídeo-difosfato redutase	II	nCGAA...N15...nCGA	147
	XAC0548		-1,19	-0,59	-0,94	precursora de gluconolactonase	II	nCGAA...N15...nCGA	I

Continua

Continuação

Classe funcional	GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				PRODUTO GÊNICO	CATEGORIA ¹	Consenso PIP	Distância do PIP
		12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.				
G	XAC2521			-1,15	-0,99	uracil fosforibosiltransferase	II	TTCGn...N15...TTCGn	297
	XAC1511		-1,36	-1,58	-1,63	tmRNA	III	nCGAA...N15...nCGAA	100
	XAC2624		-2,04	-1,78	-2,20	TRNA: val	III	nCGAA...N15...nCGAA	959
	XAC2513			-2,31	-2,05	queuosine tRNA ribosiltransferase	VII	GCGAA..N16..GCGAA	192
	XAC0001	-1,12	-1,12	-1,07	-1,07	DnaA iniciadora da replicação cromossomal	III	TTCGn...N15...TTCGn	I
	XAC2972		-0,91	-2,01	-1,63	fator sigma 54 da RNA polymerase	I	TTCGn...N15...TTCGn	250
	XAC2811			-0,86	-0,68	pseudouridilato sintase	III	nCGAA...N15...nCGAA	I
	XAC1224			-1,14	-0,98	fator de especificidade de divisão celular	V	nCGAA...N15...nCGAA	449
H	XAC3171	-2,78	-2,29	-1,91	-1,74	antiporter cation:proton	V	TTCGn...N15...TTCGn	I
	XAC4292	-2,21	-1,61		-0,96	transportadora de benzoato	V	TTCGn...N15...TTCGn	461
	XAC0317		-1,20	-0,98	-1,08	transportador MFS da família YNFM	V	TTCGn...N15...TTCGn	I
	XAC2971		-0,77	-0,65		proteína ligante de ATP de transportador	V	TTCGn...N15...TTCGn	I
	XAC3601		-0,67	-0,62	-0,83	permease de transportador ABC	V	nCGAA...N15...Negaa	I
	XAC3521			1,24		nicotinato fosforibosiltransferase	II	nCGAA...N15...nCGAA	I
I	XAC3447	-1,01	-1,65	-3,49	-2,99	proteína da biossíntese de tiamina	II	nCGAA...N15...nCGAA	26
	XAC1535		-1,08			oxoglutarate desidrogenase	I	TTCGn...N15...TTCGn	221
	XAC2727		-1,88	-1,52	-2,11	proteína possivelmente da família SCO1/SenC*	I	TTCGC...N16...TTCGG	883
	XAC3887		-1,31	-1,62	-0,99	subunidade I da citocromo C oxidase	I	TTCGn...N15...TTCGn	I
J	XAC2528	1,25			-0,70	proteína de choque térmico Hsp90	III	TTCGn...N15...TTCGn	I
K	XAC2370		1,29	2,13	2,49	proteína possivelmente secretada*	IX	TTCGn...N15...TTCGn	227
	XAC1162		-0,67	-0,89	-1,01	proteína possivelmente secretada*	IX	TTCGn...N15...TTCGn	I
	XAC1163	-1,09				proteína possivelmente secretada*	IX	TTCGn...N15...TTCGn	517
L	XAC0315		1,13	0,88	0,79	proteína hipotética	VIII	TTCGC...N16...TTCGG	663
	XAC2902			1,12	1,19	proteína hipotética conservada	VIII	GCGAA..N16..GCGAA	I
	XAC1223	-2,80				proteína hipotética conservada	VIII	nCGAA...N15...nCGAA	768
	XAC1536		-1,41	-1,38	-1,31	proteína hipotética conservada	VIII	nCGAA...N15...nCGAA	I
	XAC2827		-0,97	-1,89	-1,56	proteína hipotética conservada	VIII	nCGAA...N15...nCGAA	820

Continua

Continuação

Classe funcional	GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				PRODUTO GÊNICO	CATEGORIA ¹	Consenso PIP	Distância do PIP
		12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.				
L	XAC3933			-1,93		proteína hipotética conservada	VIII	TTCGn...N15...TTCGn	I
	XAC1508			-1,16	-0,80	proteína hipotética	VIII	GCGAA...N16..GCGAA	I
	XAC1563		-0,86		-0,81	proteína hipotética	VIII	nCGAA...N15...nCGAA	463
	XAC1566		-1,96		-1,50	proteína hipotética	VIII	GCGAA...N16..GCGAA	546
	XAC1817			-1,05	-0,93	proteína hipotética	VIII	TTCGn...N15...TTCGn	940
	XAC2490			-1,84	-1,73	proteína hipotética conservada em Xanthomonas	VIII	TTCGn...N15...TTCGn	759
M	XAC2828	0,92				proteína possivelmente da membrana*	IX	nCGAA...N15...nCGAA	I
	XAC1298	0,67				reguladora transcricional	I	TTCGn...N15...TTCGn	I
	XAC3446	-1,39		-3,39	-2,55	proteína possivelmente regulatória *	I	nCGAA...N15...nCGAA	I
	XAC3309			-1,36	-1,46	aminopeptidase	III	TTCGn...N15...TTCGn	63
	XAC3677			1,57	1,50	hidrolase da superfamília HAD *	I	nCGAA...N15...nCGAA	I

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Os valores positivos correspondem à indução gênica e os valores negativos refere-se à repressão gênica, e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do ATG inicial do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

¹De acordo com a anotação do genoma da bactéria *Xac* (<http://www.lbi.ic.unicamp.br>);

²d.a.i. = dias após a inoculação; *Reanotada;

A = Sistema de secreção do tipo III; B = Metabolismo de membrana e parede celular; C = Sistema de captação de ferro; D = Metabolismo de açúcares e degradação da parede vegetal; E = Transdução de sinais ou sistema de dois componentes; F = Metabolismo de flagelo, biofilme e adesividade; G = Metabolismo de ácidos nucleicos; H = Transportadores de membrana; I = Metabolismo energético; J = Resposta ao estresse ambiental; K = Proteínas secretadas putativas; L = Hipotéticas e M = Outros.

A análise do comportamento de expressão de cada gene ao longo da cinética de infecção (**Tabela 4**) mostrou que alguns genes tiveram sua expressão aumentada quando entraram em contato com a planta, enquanto outros foram reprimidos durante a cinética de infecção. Entretanto, estes comportamentos de indução e repressão variaram ao longo da cinética de infecção. As **Figuras 20 e 21** exemplificam melhor estes diferentes comportamentos. Cabe aqui salientar que os valores de expressão gênica da *Xac* em meio CN (meio rico utilizado como controle) foram obtidos a partir de gráficos gerados através do programa estatístico R. Os genes que não apresentaram valores de expressão nos tempos de infecção, como mostra a **Tabela 4**, significa que nos referidos tempos de infecção a expressão do gene não diferiu estatisticamente da expressão quando a bactéria se encontrava em meio de cultivo CN.

Figura 20 Perfil da expressão gênica de genes de *Xac* que se mostraram diferencialmente expressos. **A**, **B** e **C** são exemplos de genes que foram induzidos ao longo da cinética de infecção e **D** indica a indução gênica no início da infecção seguida de repressão gênica com o decorrer da infecção. D.A.I. = dias após a inoculação.

Figura 21. Perfil da expressão gênica de genes de *Xac* que se mostraram diferencialmente reprimidos. **A a D** são exemplos de genes que tiveram a expressão reprimida durante a cinética de infecção. D.A.I. = dias após a inoculação.

Além dos comportamentos de expressão verificados nas **Figuras 20 e 21** pudemos também observar nos resultados da **Tabela 4** que alguns genes foram expressos num único momento da cinética de infecção (induzidos ou reprimidos) em pontos definidos, como mostra a **Tabela 5**.

Tabela 5. Expressão temporal de alguns genes regulados pela planta.

GENES	EXPRESSÃO DIFERENCIAL TEMPORAL			
	12 horas	20 horas	3 dias após infecção	5 dias após infecção
INDUZIDOS	XAC3313			
	XAC1298			
	XAC4258	XAC4193	XAC1797	XAC0417
	XAC1463		XAC2672	
	XAC1276			
	XAC2828*			
REPRIMIDOS	XAC1330*			
	XAC2111	XAC1535		XAC2528
	XAC1223	XAC1566	XAC3933	XAC0404
	XAC1163*			

Os genes acima foram induzidos ou reprimidos apenas no tempo de infecção indicado.

*Produto gênico reanotado.

Para facilitar o entendimento do papel que esses genes (possuidores de “PIP box” na região 5’ não codificadora ou internamente na ORF) da *Xac* desempenham na interação com a planta hospedeira e no desenvolvimento dos sintomas e instalação do cancro, os mesmos foram reagrupados em classes funcionais de acordo com as funções preditas de suas proteínas.

5.5.3 Classes Funcionais

Os 67 genes diferencialmente expressos durante a cinética de infecção foram classificados de acordo com a funcionalidade da proteína por eles codificada, o que possibilitou agrupá-los nas seguintes classes funcionais:

- Sistema de secreção do tipo III;
- Metabolismo de membrana e parede celular;
- Sistema de captação de ferro;
- Metabolismo de açúcares e degradação da parede vegetal;
- Transdução de sinais (ou sistema de dois componentes);
- Metabolismo de flagelo, biofilme e adesividade;
- Metabolismo de ácidos nucleicos;
- Transportadores de membrana;
- Metabolismo energético;
- Resposta ao estresse ambiental;
- Proteínas secretadas putativas;
- Proteínas Hipotéticas;
- Outros genes diferencialmente expressos.

5.5.3.1 Sistema de Secreção do Tipo III

O sistema de secreção tipo III (SSTT), codificado por um agrupamento de genes denominados *hrp*, em geral cobre uma média de 25 Kb em genomas de bactérias Gram-negativas patogênicas de vegetais ou animais. A presença deste sistema permite que o patógeno, uma vez aderido à superfície da célula hospedeira, faça o envio de proteínas de virulência da célula bacteriana diretamente para o citoplasma da célula hospedeira eucariota. Esta intercomunicação ocorre em função de um aparato estrutural do tipo pilus (**Figura 22**), através do qual o patógeno pode injetar proteínas especializadas (efetoras) no hospedeiro, de modo a desorganizar o funcionamento das células atacadas, o que favorece a sobrevivência e multiplicação do patógeno no local invadido e leva à indução de sintomas da doença no hospedeiro (Van Gijsegem *et al.*, 1993).

Figura 22. Modelo de aparato do sistema de secreção do tipo III. O complexo proteico atravessa a membrana e a parede do patógeno, e o aparato proteico que forma o longo pilus bacteriano projeta-se no espaço intercelular e penetra na célula hospedeira, atravessando a parede celular da planta. Proteínas efetoras são translocadas para o citoplasma da célula vegetal. Fonte da Figura: www.kegg.com, com modificações.

A patogenicidade e virulência da *Xac* é determinada pelo funcionamento do SSTT, o qual é altamente conservado em bactérias Gram-negativas patogênicas às plantas (Buttner & Bonas, 2002).

A expressão dos genes que codificam o aparato de secreção tipo III em bactérias fitopatogênicas é induzida no contato com a planta ou com meio mínimo que mimetiza o espaço apoplástico do hospedeiro vegetal (Schulte & Bonas, 1992; Lindgren, 1997). A cascata regulatória que controla a expressão dos genes *hrp* varia nos diferentes patógenos de plantas. Em *Xanthomonas*, as proteínas que regulam a expressão do conjunto de genes *hrp* (“cluster *hrp*”) são as proteínas regulatórias HrpG e HrpX, codificadas numa região fora do agrupamento *hrp*.

Na bactéria fitopatogênica *Xcv* a proteína HrpX regula a expressão dos operons *hrpB*, *hrpC*, *hrpD*, *hrpE* e *hrpF* (Wengelnik & Bonas, 1996; Noël *et al.*, 2002; **Figura 4** deste trabalho). Muitos genes regulados via HrpX possuem um motivo conservado na região promotora, primeiramente descrito em *Xcv*, denominado “PIP box” (Plant Inducible Promoter box, consenso TTCGC-N15-TTCGC), e que foi proposto como elemento regulatório da expressão de genes que compõe o sistema tipo III, bem como de efetores translocados através deste sistema (Fenselau & Bonas, 1995; Wengelnik & Bonas, 1996). Entretanto, Ciesiolka *et al.* (1999) verificaram, através de mutações no consenso “PIP box” do gene de avirulência *avrRxv*, em *Xcv*, que a atividade gênica foi independente do elemento “PIP box” intacto.

Em *R. solanacearum*, os genes do agrupamento *hrp* possuem consensos do tipo “PIP box” nas respectivas regiões promotoras, denominado *hrp*_{II} box e, também são controlados de maneira dependente à proteína regulatória HrpB (homóloga ao HrpX de

Xanthomonas). Além deste motivo “PIP”, os autores ainda relataram um elemento *cis* denominado “-10 box-like”, que se assemelha ao elemento -10 de ligação ao fator σ^{70} da RNA polimerase de *E. coli* (Cunnac *et al.* 2004b). Recentemente, em *Xoo*, Furutani *et al.* (2006) mutagenizaram seqüências “PIP box” e “-10 box-like” e relataram a redução da atividade promotora em vários genes controlados via HrpX, incluindo genes associados ao SSTT, dentre outros.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram genes relacionados ao SSTT que foram diferencialmente expressos na interação da *Xac* com a planta hospedeira, como apresentado na **Tabela 6**.

Tabela 6. Expressão diferencial e temporal de genes de *Xac* relacionados ao sistema de secreção do tipo III.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12	20	3	5			
	horas	horas	d.a.i. ²	d.a.i.			
XAC0398	2,29	3,30	3,52	4,28	HrpD6	nCGAA N15 nCGAA	931
XAC0399	2,66	4,47	4,03	4,59	HrpD5	nCGAA N15 nCGAA	I
XAC0416	7,04	7,22	14,02	16,55	Hpa1	nCGAA N15 nCGAA	135
XAC2922		1,29	2,25	1,28	HrpW	TTCGn...N15...TTCGn	165
XAC0400			1,06	0,89	HpaA	nCGAA N15 nCGAA	I
XAC0417				1,98	Hpa2	TTCGn N15 TTCGn	271
XAC1208				-0,55	XopP*	TTCGn N15 TTCGn	353
XAC0404				-2,73	HpaP	nCGAA N15 nCGAA	I

*Proteína reanotada; ¹De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Os valores positivos correspondem à indução gênica e os valores negativos referem-se à repressão gênica, e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do ATG inicial do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

Podemos observar que dos oito genes diferencialmente expressos apresentados na **Tabela 6**, seis fazem parte do agrupamento *hrp* de *Xac*, sendo eles: XAC0398 (*hrpD6*), XAC0399 (*hrpD5*), XAC0400 (*hpaA*), XAC0404 (*hpaP*) XAC0416 (*hpa1*) e XAC0417 (*hpa2*), como ilustrado na **Figura 23** abaixo:

Figura 23. Agrupamento *hrp* de *Xac*. Setas indicam os genes diferencialmente expressos neste estudo. Fonte da Figura: Alegria *et al* (2004).

As proteínas HrpD5 e HrpD6 são codificadas por genes que fazem parte de um “operon” do agrupamento *hrp*. HrpD6 é uma pequena proteína citoplasmática (81 aminoácidos) e HrpD5 (313 aminoácidos) é uma proteína de membrana interna com domínio citoplasmático. Os dois genes *hrpD5* (XAC0399) e *hrpD6* (XAC0398) foram induzidos durante toda a cinética de infecção (**Tabela 6**) e possuem homólogos em *Xcv*. De acordo com Huguet *et al* (1998), as respectivas proteínas HrpD5 e HrpD6 fazem parte do sistema de secreção do tipo III e são essenciais para a interação de *Xcv* com a planta hospedeira. Além disso, informações depositadas no KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) demonstram que a proteína HrpD5 localiza-se na membrana interna da bactéria *Xac* e é parte integrante do componente estrutural do sistema de secreção do tipo III. Em estudos utilizando o sistema de duplo-híbrido em *Xac*, Alegria *et al.* (2004) relataram a interação da proteína HrpD6 com a proteína HrpW. O gene *hrpW* (XAC2922) também teve sua expressão induzida durante toda a cinética de infecção (a partir de 20 horas de cultivo em meio XAM1 que mimetiza o hospedeiro até 5 dias após o contato com a planta hospedeira, **Tabela 6**). Embora este gene foi nomeado *hrpW*, o mesmo não faz parte do agrupamento *hrp* em *Xac*. O gene *hrpW* codifica uma proteína efetora (304 aminoácidos) translocada pelo SSTT (Charkowski *et al.*, 1998). Estruturalmente trata-se de uma proteína contendo domínio “harpin”, com repetições ricas de glicina (predizendo sua translocação através da maquinaria de secreção do sistema tipo III) e possui um domínio homólogo à pectato liase (enzima pectinolítica). Alegria *et al.* (2004) sugerem, a partir dos resultados de interação proteína-proteína (duplo-híbrido), que HrpD6 esteja envolvida no direcionamento de HrpW, assim como de outras proteínas efetoras, para o aparato de secreção do tipo III. Os resultados obtidos neste estudo

sugerem uma regulação coordenada da expressão de *hrpD6* e *hrpW* aumentadas durante a infecção, dando suporte aos dados obtidos por duplo-híbrido.

Quatro genes *hpa* foram diferencialmente expressos na interação de *Xac* com o meio XAM1 e com a planta cítrica. Os genes *hpa1*, *hpa2* e *hpaA* foram induzidos, enquanto o gene *hpaP* foi reprimido aos 5 dias após a interação da bactéria com a planta hospedeira.

A indução da XAC0400, que corresponde ao gene *hpaA* (codificador de uma proteína citoplasmática de 272 aminoácidos), foi evidenciada aos 3 e 5 dias de interação com a planta hospedeira (**Tabela 6**). Estudos de mutagênese em *hpaA* de *Xcv* demonstraram que a proteína HpaA afeta a patogenicidade da bactéria em plantas susceptíveis, mas a proteína não é necessária para a indução de HR (resposta de hipersensibilidade) em interações não compatíveis. Portanto, em *Xcv*, HpaA é especificamente requerida para causar doença (Huguet *et al.*, 1998). Os mesmos autores também relataram que HpaA possui dois domínios funcionais de localização nuclear e propuseram que HpaA seja uma proteína efetora, sendo translocada para a célula vegetal através do sistema de secreção do tipo III. Alegria *et al.* (2004) também relataram, através de ensaios de duplo-híbrido, que em *Xac*, HpaA interage com outras duas proteínas (HpaB e HrcV) de maneira a resultar no direcionamento de HpaA para a maquinaria de secreção do sistema tipo III e conseqüente translocação para o interior da célula hospedeira.

O gene *hpa1* (XAC0416) codifica uma proteína (Hpa1) citoplasmática (138 aminoácidos) também rica em resíduos de glicina, assim como a proteína HrpW. Este gene mostrou-se induzido durante toda a cinética de infecção, ou seja, desde 12 horas de contato com o meio indutivo XAM1 até 5 dias de interação com a planta hospedeira (**Tabela 6**). Hpa1 mostra homologia com a proteína HpaG de *X. axonopodis* pv. *glycines* e com Hpa1 de

Xoo. A proteína Hpa1 tem sido bastante estudada no patossistema *Xoo*::arroz (Zhu *et al.*, 2000; Furutani *et al.*, 2004). Zhu *et al.* (2000) verificaram que em *Xoo hpa1* é precedido por um motivo do tipo “PIP box” a 135 pb da metionina inicial (assim como verificado em *Xac*), e em experimentos de mutagênese e deleção do *hpa1* mostraram que a perda do gene levou a uma drástica redução da patogenicidade na planta hospedeira. Os autores também sugerem que, devido ao alto conteúdo de glicina na proteína Hpa1, ela seja secretada pelo sistema de secreção do tipo III. Em 2004, Furutani *et al* demonstraram, através de análises do sobrenadante de um meio indutor (XOM2) utilizado para cultivo de *Xoo*, que a proteína Hpa1 teve sua expressão regulada pela proteína HrpX, e que é secretada por meio da maquinaria de secreção do sistema tipo III.

O gene *hpa2* (XAC0417) foi induzido aos 5 dias após o contato com a planta hospedeira (**Tabela 6**), e codifica Hpa2, uma proteína de membrana externa (com 139 aminoácidos). De acordo com Zhu *et al.* (2000), o gene *hpa2* de *Xoo* também é precedido pelo elemento conservado do tipo “PIP box” a 165 pb do início do gene. A função da proteína Hpa2 ainda é desconhecida, porém acredita-se que ela seja uma efetora do sistema secretório do tipo III (Zhu *et al.* 2000).

A proteína citoplasmática HpaP (205 aminoácidos) é codificada pelo gene *hpaP* (XAC0404), cuja expressão gênica apresentou-se reprimida aos 5 dias após o contato com a planta hospedeira (**Tabela 6**). Até o momento não foi determinada nenhuma função para esta ORF que faz parte do agrupamento *hrp*. Entretanto, através da conciliação de resultados experimentais de translocação de proteínas efetoras com estudos de bioinformática realizados por vários autores (Collmer *et al.*, 2002; Guttman *et al.*, 2002; Petnicki-Ocwieja *et al*, 2002; Cunnac *et al.*, 2004b), alguns requisitos para que uma proteína seja considerada como

efetora, secretada pelo SSTT, foram estabelecidos para a porção N-terminal de proteínas efetoras. A proteína HpaP de *Xac* obedece as exigências relatadas pelos autores citados acima e, portanto, supomos que seja secretada pelo SSTT, embora ainda não existam evidências experimentais a este respeito. O fato do gene *hpaP* ter sido reprimido aos 5 dias após o contato com a planta hospedeira, sugere que esta proteína efetora não seja requerida nos tempos mais tardios da infecção, momento em que o patógeno já se estabeleceu na planta hospedeira. A não detecção da indução da expressão de *hpaP* em 12 horas, 20 horas (meio XAM1) e 3 dias após o contato com a planta comparativamente ao meio de cultivo rico CN, sugere que o gene estava sendo expresso mas não em níveis significativamente maiores que em meio CN.

Um outro gene do agrupamento *hrp* que mostrou-se reprimido aos 5 dias após a interação com a planta hospedeira foi o gene XAC1208, que era considerado uma proteína hipotética mas que em reanotação recente (este trabalho, **Tabela 6**) revelou tratar-se de uma proteína efetora do SSTT, homóloga ao gene *xopP* de *Xcv*. O gene XAC1208 codifica uma proteína citoplasmática (PSORT – “prediction of protein sorting signals and localization sites in amino acids sequences”) de 724 aminoácidos, com 90% de similaridade com a XopP (“*Xanthomonas* outer protein P”) de *Xcv*, e que até o momento também não tem nenhuma função predita. Entretanto, assim como HpaP, XopP preenche as exigências requeridas para que seja considerada como uma proteína efetora que se transloca pelo aparato de secreção do sistema tipo III. O gene XAC1208 de *Xac* também se mostrou reprimido aos 5 dias de interação com a planta cítrica, mas não houve diferença significativa nos tempos anteriores da cinética de infecção em comparação ao seu cultivo em meio CN, sugerindo que esta proteína seja produzida em maior quantidade antes do quinto dia de infecção. Reforçando

esta hipótese, resultados preliminares da análise proteômica “in vivo” na interação *Xac*::planta hospedeira mostram que a proteína codificada pelo gene XAC1208 foi encontrada apenas em bactérias exsudadas no quinto dia de interação com a planta hospedeira, não sendo detectada em 24 horas (cultivada em meio XAM1) e nem em 3 dias de interação com o hospedeiro (Facincani, A.P., comunicação pessoal).

Occhialini *et al.* (2005) relataram pela primeira vez, em estudo de expressão gênica em *Ralstonia solanacearum*, que dentre os genes que dirigem a patogenicidade (genes com consenso hrp_{II} box na região promotora) e que são controlados pela proteína regulatória HrpB, foram detectados genes positivamente ou negativamente regulados, ou seja, estes genes regulados via HrpB podem ser induzidos ou reprimidos. Estes dados concordam com os resultados obtidos neste estudo, pois pudemos verificar genes relacionados à patogenicidade e contendo “PIP box” em *Xac* sendo ativados ou reprimidos durante a interação da bactéria com a planta hospedeira.

5.5.3.2 Metabolismo de Membrana e Parede Celular

A parede celular bacteriana é composta, dentre outros componentes, por uma macromolécula complexa e majoritária denominada peptídeoglicana (também chamada de mucopeptídeo ou mureína) que confere rigidez à parede e conseqüente proteção contra variações osmóticas. As bactérias Gram-positivas possuem grandes quantidades de peptídeoglicanas, conferindo uma camada mais espessa à parede, assim como maior rigidez quando comparada com as bactérias Gram-negativas, as quais possuem uma fina camada de

peptídeoglicana em sua parede celular e é revestida pela membrana externa que, por sua vez é composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (Pelczar *et al.*, 1996)

Nas situações em que uma bactéria patogênica confronta-se com a célula hospedeira, todo um repertório de genes tem sua expressão alterada, com a conseqüente produção de proteínas necessárias ao seu desenvolvimento no ambiente em que se encontra, adaptando-se à situação de confronto à célula vegetal hospedeira. Como é sabido, em espécies de *Xanthomonas*, assim como de outras bactérias patogênicas, existe a necessidade de ancoragem de proteínas na membrana da célula bacteriana, de modo a permitir a adesão e interação com as células do hospedeiro e conseqüente sucesso na indução da doença. No entanto, para que o patógeno esteja preparado para o ataque ao hospedeiro, é necessário uma rearquitetura da membrana bacteriana assim como da parede celular (Lang, 2000).

Corroborando dados da literatura, neste estudo foi possível verificar que 6 genes relacionados ao metabolismo de membranas e da parede celular bacteriana tiveram sua expressão modificada, indicando uma readaptação destas estruturas macromoleculares na interação *Xac*::citros (**Tabela 7**).

Tabela 7. Expressão diferencial e temporal de genes relacionados ao metabolismo de parede e membrana bacteriana.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC1463	0,98				fosfolipase tipo A1	nCGAA..N15..nCGAA	I
XAC0360	1,75	2,12	2,81	2,88	glicerol-3-fosfato desidrogenase	nCGAA..N15..nCGAA	38
XAC1375		1,10	0,70	0,97	ciclopropano ácido graxo fosfolipídeo sintase	nCGAA...N15..nCGAA	260
XAC0618		0,76	0,77	0,89	proteína da biossíntese de glucano periplasmático	TTCGC..N16..TTCGG	I
XAC2542			1,60	1,62	permease de aminoácidos	GCGAA..N16..GCGAA	I
XAC0781		-0,60	-0,98		D-alanina-D-alanina ligase B	TTCGC...N16...TTCGG	799

¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Os valores positivos correspondem à indução gênica e os valores negativos referem-se à repressão gênica, e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do ATG inicial do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

A indução da expressão do gene XAC1463 é um exemplo de resposta precoce ao contato com o hospedeiro. Este gene codifica uma proteína (406 aminoácidos) de membrana externa (predita pelo programa PSORT), uma enzima com atividade de fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32). Ela tem como substrato a fosfatidilcolina, produzindo o 2-acilglicerolfosfocolina, um componente da via do metabolismo de glicerofosfolipídeos. Um outro gene dessa mesma via metabólica também foi induzido durante a cinética de infecção. Trata-se do gene XAC0360, que codifica a enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.99.5), cujo produto é a dihidroxicetona fosfato, também um componente da via dos glicerofosfolipídeos. Esta via metabólica dos

glicerofosfolipídios resulta na biossíntese de constituintes fosfolipídicos da membrana. Outro gene relacionado com a síntese de fosfolipídios, XAC1375, também mostrou-se induzido a partir de 20 horas de cultivo em meio indutivo até o final da cinética de infecção em folha de laranjeira (5 dias). Este gene codifica uma proteína citoplasmática (451 aminoácidos) denominada ciclopropano ácido graxo fosfolipídeo sintase, que tem como substrato a S-adenosil-L-metionina e o ácido graxo fosfolipídico olifínico. Estes resultados sugerem que os genes XAC1463, XAC0360 e XAC1375, foram induzidos para permitir uma reorganização na composição de fosfolipídeos da membrana externa bacteriana, possibilitando uma adaptação da membrana para acomodar as novas proteínas necessárias para a situação de ataque à planta hospedeira.

O gene XAC0618, codificador de uma proteína integral de membrana relacionada com a biossíntese de glucanas periplasmáticas, foi induzido após 20 horas de cultivo em meio indutivo e nos tempos 3 e 5 dias após o contato da bactéria com a planta hospedeira. Esta enzima (EC 2.4.1.-) está implicada no metabolismo de parede celular. Os glucanos periplasmáticos osmorregulados (GPOs) são encontrados nos espaços periplasmáticos de bactérias Gram-negativas, e a concentração deste glucano bacteriano aumenta em resposta ao decréscimo de osmolaridade do ambiente em que a bactéria se encontra (Bohin, 2000). Esta condição de baixa osmolaridade possivelmente ocorre nos espaços intercelulares do vegetal durante o estabelecimento da bactéria (início da infecção), período este em que há pouca disponibilidade de nutrientes para o fitopatógeno. Page *et al.* (2001) relataram que mutantes deste gene GPOs em *Erwinia chrysanthemi* apresentaram-se não patogênicos em plantas hospedeiras e, interessante, também mostraram uma redução na síntese e secreção de pectato liase (enzima degradativa de componentes da parede celular do vegetal). Esta redução da produção de pectato liase está associada ao decréscimo de sua secreção através da

parede bacteriana, sugerindo que os GPOs são constituintes essenciais da parede, uma vez que favorecem a funcionalidade de secreção de pectato liase através da mesma. GPOs também foram relatados como necessários para o desenvolvimento de sintomas induzidos por *P. syringae* pv. *syringae* em feijoeiro, bem como para a resposta de hipersensibilidade em plantas não hospedeiras (Mukhopadhyay *et al.*, 1988).

Um outro gene relacionado a constituintes de parede é o XAC0781, que codifica a enzima D-alanina-D-alanina ligase B (EC 6.3.2.4). Trata-se de uma proteína de 319 aminoácidos que de acordo com informações contidas no KEGG (“Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”), faz parte da via de biossíntese de peptídeoglicana. O gene XAC0781 mostrou-se reprimido em *Xac* após 20 horas de interação com o meio XAM1 e aos três dias de contato com a planta hospedeira. Enquanto a síntese de peptídeoglicanas, componentes da parede celular de *Xac*, está sendo reprimida (XAC0718), a síntese de GPOs e de fosfoglicerolípídeos de membrana (XAC1463 e XAC0360) estão sendo estimuladas, resultando em modificações na parede e membrana celular que poderiam estar atuando na capacitação da *Xac* em se instalar e se manter no hospedeiro.

O gene XAC2542, codificador de uma permease de aminoácidos, por sua vez, teve sua expressão aumentada aos 3 e 5 dias após a interação bactéria::planta, sugerindo um papel na captação de aminoácidos liberados pela ação do patógeno sobre as células vegetais atacadas.

Em síntese, os genes evidenciados a partir deste estudo como diferencialmente expressos e implicados na síntese de proteínas do metabolismo de membrana e parede bacteriana (**Tabela 7**), parecem ter sua expressão controlada segundo um mecanismo de regulação coordenado temporalmente a partir da interação com plantas cítricas hospedeiras. Após 12 horas da interação bactéria-planta, ou seja, no início do processo

infeccioso, o gene que codifica uma fosfolipase (XAC1463) tem sua expressão induzida, podendo levar à alteração na composição dos fosfolipídeos da membrana externa bacteriana e conseqüente adaptação da mesma à situação de ataque ao hospedeiro vegetal. Após 20 horas, 3 dias e 5 dias da interação com o hospedeiro, os genes XAC1375 e XAC0360, responsáveis pela síntese de compostos de fosfolipídeos tiveram sua expressão ativada, o que sugere uma complementação da ação fosfolipásica (XAC1463) na reestruturação da membrana externa da bactéria. A parede celular da *Xac* parece adaptar-se conjuntamente às modificações da membrana celular, pois um gene responsável pela produção de glucanas periplasmáticas (XAC0618) também foi induzido durante a infecção. Em paralelo, a aquisição de aminoácidos (XAC2542) pelo fitopatógeno é induzida (3 e 5 dias) após a ação degradativa da bactéria sobre a parede vegetal e conseqüente disponibilização de nutrientes na forma de aminoácidos.

5.5.3.3 Sistema de Captação de Ferro

A captação de ferro em bactérias requer um transporte ativo e é de grande importância por se tratar de um componente essencial para o seu metabolismo, atuando em processos como respiração, síntese de RNA e na inativação de espécies ativas de oxigênio (Wandersman & Delepelaire, 2004). Sob circunstâncias aeróbicas o ferro é oxidado rapidamente ao íon férrico (Fe^{3+}), sendo esta forma de baixíssima solubilidade em pHs fisiológicos (Raymond & Dertz, 2004). A estratégia comum das bactérias Gram-negativas para a captação de ferro é a síntese de sideróforos, moléculas que possuem elevada afinidade para o íon férrico, capazes de quelar e reduzir Fe^{3+} para Fe^{2+} . Os sideróforos secretados no meio externo se complexam com íons férrico (Fe^{3+}) e são reconhecidos na superfície celular bacteriana por receptores específicos da membrana

externa, também conhecidos como receptores dependentes de TonB. Estes receptores se encontram na membrana externa e transportam o complexo sideróforo/ Fe^{2+} para o interior da célula bacteriana, com o auxílio de proteínas constituintes do Sistema Ton. O Sistema Ton de *E. coli* (**Figura 24**) consiste de três proteínas, TonB, ExbB e ExbD (numa razão molar de 1:7:2), que interagem umas com as outras formando um complexo que responde ao gradiente de prótons na membrana externa. Este sistema fornece energia necessária para que os receptores de sideróforos dependentes de TonB realizem o transporte unidirecional de sideróforos. A maioria das proteínas TonB são periplasmáticas e possuem a região N-terminal ancorada na membrana citoplasmática, enquanto um segmento específico da região C-terminal possui alta afinidade com um motivo da região N-terminal da proteína receptora de sideróforo denominado TonB box (**Figura 24**). Esta interação da proteína TonB com o motivo TonB box do receptor dependente de TonB favorece o transporte de íons de ferro para o interior da célula bacteriana (Braun & Braun, 2002; Carter *et al.* 2006).

Figura 24. Transporte de Fe^{3+} através da membrana externa de *Escherichia coli*. (Braun & Braun, 2002).

O controle e regulação de expressão dos genes relacionados ao metabolismo de ferro estão ligados ao gene *fur* (“**f**erric **u**ptake **r**egulator”), sendo este um gene regulador do metabolismo de ferro em patógenos bacterianos. Em *E.coli* vários genes são regulados pelo *fur*, dentre eles os genes responsáveis pela síntese e transporte de sideróforos, genes codificadores de proteínas citoplasmáticas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo e outros que codificam proteínas relacionadas a fatores de virulência, como colicinas e hemolisinas, indicando uma ligação entre as vias regulatórias do metabolismo de ferro e da expressão de fatores de virulência (Hantke, K., 2001).

Em *Xac* a síntese de sideróforos foi verificada “in vitro” por Etchegaray *et al.* (2004). Os resultados mostraram que a bactéria foi capaz de se desenvolver em meio de cultura líquido com deficiência de ferro e, após o cultivo das células bacterianas, o sobrenadante foi utilizado para ensaios de determinação de sideróforos.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram a indução de quatro genes codificadores de receptores dependentes de TonB, sendo eles, XAC1276, XAC1435, XAC2672 e XAC1310, como apresentado na **Tabela 8**.

Tabela 8. Expressão diferencial e temporal de genes relacionados ao sistema de captação de ferro.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC1276	1,60				receptor dependente de TonB	TTCGn...N15..TTCGn	I
XAC1435	0,99	0,48			receptor de ferro dependente de TonB	nCGAA...N15..nCGAA	271
XAC2672			0,99		proteína Oar (receptor dependente de TonB)	nCGAA...N15..nCGAA	I
XAC1310			0,77	0,68	receptor dependente de TonB	nCGAA...N15..nCGAA	I

¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de indução de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão gênica quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC1276 foi induzido 12 horas após o contato com o meio indutivo e codifica para uma proteína de 765 aminoácidos. O gene XAC1435 codifica uma proteína contendo 713 aminoácidos e também foi induzido no início do contato com o meio indutivo (12 horas) e até 20 horas após o contato com este meio. O gene XAC2672 codifica uma proteína contendo 1075 aminoácidos e mostrou-se induzido aos três dias após o confronto com a planta hospedeira, enquanto o XAC1310, que codifica uma proteína de 869 aminoácidos, foi induzido nos tempos finais da cinética de infecção, ou seja, aos três e cinco dias após o contato com a planta hospedeira. De acordo com as

predições geradas pelo programa PSORT, todas estas quatro proteínas induzidas ao longo da cinética de infecção são proteínas de membrana externa, o que viabilizaria o contato das mesmas com o complexo sideróforo-íons de ferro que se encontram no ambiente da célula hospedeira.

A indução da expressão de genes que codificam receptores de íons de ferro sugere que a *Xac* se encontra em meio pobre em ferro, tanto “in vitro” quanto “in vivo”, sendo que a maximização da captação de ferro implica no aumento da expressão dos receptores dependentes de TonB. Além disso, há uma sequência temporal na indução desses receptores, com receptores expressos em períodos mais iniciais e outros em tempos intermediários da infecção.

5.5.3.4 Metabolismo de Açúcares e Degradação da Parede Vegetal

A interação que se estabelece entre plantas e patógenos constitui-se num confronto entre dois sistemas morfo-genético-fisiológicos, através do qual cada sistema tenta predominar sobre o outro.

A parede celular vegetal é constituída basicamente por três componentes estruturais: a lamela média e as paredes primária e secundária. A lamela é constituída principalmente de substâncias pécticas (polissacarídeos), enquanto que as paredes primária e secundária são constituídas basicamente por outros sacarídeos do tipo celulose e hemicelulose. A hemicelulose encontrada nas paredes secundárias é constituída por arabinose, xilose, glicose, manose e galactose (Raven *et al.*, 2001).

A degradação da parede celular vegetal, realizada pela *Xac*, através da ação degradativa de hidrolases do tipo celulasas, pectinases e glicosidases resulta na disponibilização de nutrientes para que o fitopatógeno consiga se multiplicar nos

espaços apoplásticos do hospedeiro. No presente trabalho foi verificado a indução de genes codificadores para estas classes de hidrolases (**Tabela 9**).

Tabela 9. Expressão diferencial e temporal de genes do metabolismo de açúcares e degradação da parede celular vegetal.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC4258	0,94				xilosidase/arabinosidase	TTCGn...N15...TTCGn	943
XAC3313	0,95		0,72		alfa-glucosidase	TTCGn...N15...TTCGn	I
XAC2922		1,29	2,25	1,28	pectato liase (HrpW)	TTCGn...N15...TTCGn	165

¹De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de indução de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão gênica quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC4258 codifica uma proteína de 345 aminoácidos que está relacionada à degradação de xilobiase e arabinose, açúcares estes presentes nos polissacarídeos da parede vegetal. O gene XAC2922 (304 aminoácidos) também codifica proteína com função hidrolítica de polissacarídeos da parede celular vegetal, assim como o gene XAC3313, o qual codifica uma alfa-glicosidase (EC 3.2.1.20) que degrada dissacarídeos contendo ligações glicosídicas α -1,4. Cabe salientar que a pectato liase codificada pelo gene XAC2922 é secretada pelo aparato de secreção do sistema tipo III (Charkowski *et al.*, 1998) e já foi descrita na classe funcional do sistema de secreção do tipo III. Foi verificado que a expressão gênica da xilosidase/arabinosidase (XAC4258) foi induzida em 12 horas de cultivo da bactéria em meio indutivo XAM1 e

decreceu para níveis basais a partir de 20 horas de contato com o meio indutivo e assim permaneceu até 5 dias de infecção. A indução da expressão da pectato liase, diferentemente, pode ser observado a partir de 20 horas em meio indutivo, aumentando no terceiro dia e no quinto dia retornou aos níveis de expressão observados no tempo de 20 horas de interação com o meio XAM1. Os resultados obtidos no macroarranjo sugerem que a bactéria em estágio infectante produz hidrolases com ação sobre polímeros da parede celular do hospedeiro, tais como celulasas (xilosidase e arabinosidase), pectinases (pectato liase) e glicosidases para alcançar o objetivo final que é a degradação dos polissacarídeos da parede vegetal.

5.5.3.5 Transdução de Sinais ou Sistema de Dois Componentes

O sistema regulador de dois componentes permite respostas a mudanças no meio ambiente, regulando genes envolvidos na adaptação de bactérias. Este sistema, normalmente é formado por uma proteína quinase que percebe a mudança ambiental, e uma proteína reguladora que, uma vez fosforilada pela quinase sensora, é ativada e transduz o sinal do meio externo para o meio intracelular, estimulando ou reprimindo a transcrição de genes necessários para a resposta adequada do organismo à situação confrontada (West & Stock., 2001).

Dois genes codificando proteínas sensora e reguladora do sistema de dois componentes tiveram sua expressão modificada no contato com a planta, sendo eles a XAC4193 e XAC1797, mostradas na **Tabela 10**.

Tabela 10. Expressão diferencial e temporal de genes relacionados à transdução de sinais.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC4193		0,90			proteína sensora do sistema de dois componentes	nCGAA...N15...nCGAA	I
XAC1797			0,99		proteína regulatória do sistema de dois componentes	nCGAA...N15...nCGAA	701

¹De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de indução de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão gênica quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC4193 codifica uma proteína sensora de 1.151 aminoácidos, pertencente a um sistema de dois componentes, que teve sua expressão induzida 20 horas após a *Xac* entrar em contato com o meio indutivo XAM1. De acordo com o programa PSORT, esta é uma proteína integral de membrana citoplasmática que apresenta 11 domínios transmembranares, podendo estar relacionada à percepção do ambiente extracelular representado pelo meio indutor e envio de sinal para o controle da transcrição de genes relacionados à patogenicidade e virulência. Por sua vez, o gene XAC1797 codifica uma proteína reguladora (189 aminoácidos) também pertencente a um sistema de dois componentes, e sua expressão foi induzida apenas aos três dias de infecção. Esta proteína regulatória é predita como citoplasmática (PSORT) mas associada à membrana plasmática, o que a habilitaria a receber o sinal captado e transduzi-lo de modo a alterar o perfil de transcrição gênica quando a bactéria entra em contato com a planta hospedeira. Uma hipótese seria de que as proteínas sensora e reguladora, codificadas pelos genes XAC4193 e XAX1797, respectivamente, possam constituir um sistema de dois componentes responsivo ao contato com o hospedeiro

vegetal. Esta hipótese poderia ser testada através de ensaios de interação proteína-proteína em levedura utilizando o sistema de duplo-híbrido.

5.5.3.6 Flagelo, Biofilme e Adesividade

Tem sido demonstrado que os flagelos possuem múltiplas funções, como na adesão, na formação de biofilme e funções de invasão na patogênese (Hu *et al.*, 2005). Os resultados aqui obtidos também apontam para a importância da estrutura do tipo flagelo no processo infeccioso da *Xac*, uma vez que o gene XAC1935, codificador de uma proteína que participa na biogênese de flagelo, mostrou-se induzido durante todo o período de interação estudado (**Tabela 11**).

Os microrganismos em geral são capazes de perceber as mudanças ambientais e conseqüentemente disparar a expressão de genes codificadores de proteínas que favorecem a sua manutenção e multiplicação no novo ambiente. Dentre essas proteínas estão as hemaglutininas e as proteínas com domínio GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe). As hemaglutininas são uma classe de proteínas filamentosas associadas à superfície da membrana celular. Em *Bordetella pertussis* (patógeno do epitélio respiratório humano) um mutante para o gene *fhaB*, que codifica a proteína FHA responsável pela estrutura do filamento de hemaglutinina, perdeu a aderência à célula hospedeira, sendo reconhecida como importante e essencial para a aderência nas células eucariotas e considerada também como um fator de virulência (Relman *et al.*, 1989). Proteínas com domínio GGDEF também são preditas como reguladoras da adesividade na superfície celular via regulação dos níveis do mensageiro secundário diguanilato cíclico (c-diGMP). Evidências experimentais sugerem que o domínio GGDEF atua como uma nucleotídeo ciclase responsável pela síntese de diguanilato cíclico (D'Argenio & Miller,

2004). Em *Vibrio cholerae* a expressão de genes requeridos para a formação de biofilme é ativado pelo aumento intracelular da concentração de diguanilato cíclico (c-diGMP) (Tischer & Camilli, 2005).

No presente estudo foi verificada a indução de um gene (XAC0424) relacionado à síntese de uma proteína anotada inicialmente como hipotética e reanotada como diguanilato ciclase putativa pertencente ao grupo de proteínas contendo o domínio GGDEF, bem como a repressão de um gene (XAC1816) codificador de uma proteína relacionada à hemaglutinina (**Tabela 11**).

Tabela 11. Expressão diferencial e temporal de genes relacionados à formação de flagelo, biofilme e adesividade.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC1935	0,80	2,95	1,75	2,41	proteína envolvida na biogênese de flagelo	nCGAA...N15...nCGAA	I
XAC0424		2,12	2,24	2,05	diguanilato ciclase putativa (domínio GGDEF)*	nCGAA...N15...nCGAA	107
XAC1816				-1,57	proteína relacionada a hemaglutinina/ hemolisina	TTCGn...N15...TTCGn	I

*Proteína reanotada; ¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Os valores positivos correspondem à indução gênica e os valores negativos referem-se à repressão gênica, e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC0424 foi induzido a partir de 20 horas de contato com o meio indutivo XAM1 até o final da cinética de infecção (**Tabela 11**). Esta indução pode estar relacionada à percepção do hospedeiro e à adesividade na superfície celular deste.

O gene que codifica a proteína relacionada à hemaglutinina (XAC1816) apresentou sua expressão reprimida aos 5 dias de interação com a planta hospedeira

(**Tabela 11**). Diante deste resultado podemos inferir que a expressão deste gene manteve-se próxima aos níveis basais representados pela expressão em meio CN e caiu aos 5 dias de infecção, sugerindo que a função desta proteína no processo infeccioso possa ser essencialmente requerida nas etapas iniciais da doença (encharcamento e hiperplasia) e já não mais necessária na fase necrótica da doença. Deve-se ressaltar que também no meio líquido de cultivo a *Xac* se adere às paredes do frasco, sendo que esta hemaglutinina poderia estar envolvida neste processo, bem como na fase inicial de infecção na planta.

5.5.3.7 Metabolismo de Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos, DNA e RNA assumem a função basal de armazenar e expressar as informações genéticas e de transmitir essas informações para seus descendentes, além de regular a síntese de proteínas dos processos celulares.

Genes relacionados ao metabolismo basal de ácidos nucleicos mostraram-se reprimidos quando o patógeno encontra-se no ambiente da planta hospedeira e em meio de cultura que mimetiza este ambiente, como mostra a **Tabela 12**.

Tabela 12. Expressão diferencial e temporal de genes relacionados ao metabolismo de ácidos nucleicos.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC2111	-1,97				ribonuclease E	GCGAA..N16.GCGAA	I
XAC1330	-1,26				proteína da família de adenilato ciclase*	TTCGn...N15...TTCGn	937
XAC4074	-1,56	-1,72	-1,53	-1,94	cadeia β da ribonucleosídeo difosfato redutase	nCGAA..N15..nCGAA	147
XAC0548		-1,19	-0,59	-0,94	precursora de gluconolactonase	nCGAA...N15...nCGAA	I
XAC2521		-0,78	-1,15	-0,99	uracil fosforibosiltransferase	TTCGn..N15..TTCGn	297
XAC1511		-1,36	-1,58	-1,63	tmRNA	nCGAA..N15..nCGAA	100
XAC2624		-2,04	-1,78	-2,20	tRNA-Val	nCGAA.N15.nCGAA	959
XAC2513			-2,31	-2,05	queuosine tRNA ribosiltransferase	GCGAA..N16..GCGAA	192
XAC0001	-1,12	-1,12	-1,07	-1,07	proteína DnaA iniciadora da replicação cromossomal	TTCGn..N15..TTCGn	I
XAC2972		-0,91	-2,01	-1,63	fator sigma 54 da RNA polimerase	TTCGn..N15..TTCGn	250
XAC2811			-0,86	-0,68	pseudouridilato sintase	nCGAA..N15..nCGAA	I
XAC1224			-1,14	-,098	fator de especificidade de divisão celular topológica	nCGAA..N15..nCGAA	449

¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de repressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

Vários genes relacionados ao metabolismo de purina e/ou pirimidina foram reprimidos durante toda a cinética de infecção *Xac*::hospedeiro. O gene XAC1330 foi reprimido apenas em 12 horas de contato com o meio indutor XAM1 (**Tabela 12**). Este gene codifica uma enzima putativa da família da adenilato ciclase (EC 4.6.1.1) de 165

aminoácidos. Ela participa na via do metabolismo de purina, e tem como substrato o ATP produzindo 3',5'-AMP cíclico, ou seja, participa de passos anteriores à formação de DNA e RNA, o que nos leva a inferir sobre a redução da síntese dos ácidos nucleicos logo no início da interação *Xac*::hospedeiro. O gene XAC2811 codifica a enzima pseudouridilato sintase (EC 4.2.1.70) de 240 aminoácidos, e faz parte da via metabólica de pirimidina. Esta enzima tem como substrato a pseudouridina 5'-fosfato produzindo uracil, sendo que também participa no reverso desta reação. Este gene, portanto, participa na síntese de moléculas de RNA, e que por sua vez mostrou-se reprimido aos três e cinco dias de contato com a planta hospedeira (**Tabela 12**), o que nos sugere a redução dessas moléculas nos referidos tempos de infecção. Outros genes envolvidos com o metabolismo de purina e pirimidina são: XAC4074 e XAC2511. O gene XAC4074 mostrou-se reprimido durante toda a cinética de infecção (**Tabela 12**). Este gene codifica uma enzima da cadeia β da ribonucleosídeo difosfato redutase (EC: 1.17.4.1) e que tem como substrato a 2'-D-desoxirribonucleosídeo, resultando em ribonucleosídeo difosfato. Portanto este gene, XAC4074, codifica uma enzima (347 aminoácidos) que participa da via metabólica de purinas e pirimidinas, precursoras de DNA e RNA, e que se mostrou reduzido, o que nos permite inferir que a síntese dessas moléculas também foi reduzida durante a cinética de infecção *Xac*::hospedeiro. Já o gene XAC2521 foi reprimido a partir de 20 horas de contato com o meio indutor e permaneceu reprimido até o final da cinética de infecção em folhas de laranjeira (**Tabela 12**). Este gene codifica a enzima uracil fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.9) de 210 aminoácidos, que tem como substrato a uridina 5'-monofosfato, resultando em uracil, e também atua no reverso desta reação. Este foi outro gene envolvido na via metabolismo de pirimidina que mostrou-se reprimido, dando suporte para as inferências anteriores de

que a *Xac* deve ter reduzido seu metabolismo de ácidos nucléicos em função do meio em que se encontra.

O gene XAC0548 codifica uma proteína de 306 aminoácidos, sendo ela uma enzima precursora de gluconolactonase (EC 3.1.1.17). Esta enzima faz parte da via metabólica das pentoses fosfato, que é uma via alternativa oxidativa para a glicose. Esta via resulta em oxidação e descarboxilação na posição C-1 da glicose, produzindo NADPH e pentose fosfato. O NADPH fornece radicais redutores para as reações celulares biossintéticas, e as pentoses fosfato (D-ribose-5-fosfato) são precursoras essenciais das biossínteses de nucleotídeos e ácidos nucléicos. A enzima codificada pelo gene XAC0548, precursora de gluconolactonase, tem o D-glucono-1,5-lactona como substrato, produzindo D-gluconato. Este gene também foi reprimido a partir de 20 horas de interação com o meio XAM1 até 5 dias de contato com a planta hospedeira (**Tabela 12**). Tendo em vista que um dos caminhos da via das pentoses fosfato é a formação de riboses para a síntese de DNA e RNA, mais uma vez estes resultados sugerem que a síntese de ácidos nucléicos da *Xac* é reduzido em situações de um novo ambiente em que ela irá se manter.

O gene XAC0001 é codificador da proteína DnaA iniciadora da replicação cromossomal (442 aminoácidos) e foi reprimida durante toda a cinética de infecção, ou seja, desde 12 horas de contato com o meio indutor até 5 dias de interação com a folha de laranjeira (**Tabela 12**). Este resultado parece refletir os já comentados acima, uma vez que observamos repressões de genes que codificam proteínas envolvidas nas vias metabólicas de riboses, bases pirimidinas e purinas. O fato do gene responsável pela proteína DnaA iniciadora de replicação apresentar-se reprimido, parece estar relacionado com a repressão do gene XAC1224. Este gene foi reprimido em três e cinco dias de interação com a planta hospedeira (**Tabela 12**), e codifica um fator de

especificidade de divisão celular topológica (85 aminoácidos), ou seja, uma proteína que está relacionada com a formação do septo para a divisão celular.

O gene XAC2972 é codificador de um fator sigma 54 de RNA polimerase (479 aminoácidos) e foi reprimido a partir de 20 horas de contato com o meio indutor até cinco dias de interação com a planta hospedeira (**Tabela 12**). Como já comentado anteriormente, vários genes codificadores de proteínas envolvidas na biossíntese de ácidos nucleicos foram reprimidos, o que dá suporte também para a repressão verificada para o gene XAC2972. Este resultado é um indicativo de que pelo menos alguns genes não estão sendo transcritos nos referidos tempos da cinética de infecção, e este fator sigma da RNA polimerase poderia estar reconhecendo estes genes reprimidos e portanto também não está sendo necessária neste momento.

O gene XAC2111 codifica a enzima ribonuclease E (EC 3.1.4.-), uma proteína de 1.221 aminoácidos e que está envolvida na biogênese de ribossomos e na tradução protéica. Esta enzima atua sobre o N-acetil-D-manosamina produzindo UDP-N-acetil-D-manosamina + H₂O. O gene codificador da ribonuclease E mostrou-se reprimido em 12 horas de contato com o meio XAM1 (**Tabela 12**), o que nos leva a deduzir que o metabolismo relacionado à tradução de algumas proteínas também está reduzido.

O gene XAC2513 codifica a enzima queuosine tRNA ribosiltransferase (EC 2.4.2.29) de 381 aminoácidos. Este RNA de transferência é responsável pela síntese de um nucleosídeo hipermodificado, a queuosine (Q), no RNA de transferência. O gene codificador desta enzima mostrou-se reprimido em três e cinco dias de contato com a planta hospedeira (**Tabela 12**). Um outro gene codificador de RNA de transferência também foi reprimido, o XAC2624, que codifica um transportador para o aminoácido valina. Este gene mostrou-se reprimido nos tempos de 20 horas de contato com o meio indutor até o final da infecção (**Tabela 12**). Sabendo-se que os RNAs de transferência

são requeridos durante a síntese protéica, podemos inferir que algumas proteínas não estão sendo sintetizadas durante os referidos tempos de interação *Xac*::planta cítrica citados acima comparativamente com a *Xac* cultivada em meio rico. Parece-nos coerente as interpretações quanto à redução de algumas sínteses protéicas, uma vez que as sínteses de precursores de DNA, RNA e fatores de transcrição também mostraram-se reprimidas durante esta cinética de infecção da *Xac*::hospedeiro.

O gene XAC1511 codifica um RNA do tipo transferência/mensageiro (tmRNA), e que foi reprimido desde 20 horas de interação com o meio indutor XAM1 até o final da cinética de infecção com a folha de laranjeira (**Tabela 12**). O tmRNA é processado por ribonucleases específicas, sendo elas a ribonuclease P e a ribonuclease E e/ou ribonuclease III. O tmRNA, também conhecido como SsrA ou RNA 10Sa, tem uma estrutura complexa, com uma região semelhante ao tRNA e outra semelhante ao mRNA, sendo o único híbrido presente em todas as eubactérias. tmRNA reconhece ribossomos (70S) que está com problemas na tradução e conduz a proteína inacabada à proteólise. O tmRNA age primeiro como um RNA de transferência carregando uma alanina até o ribossomo que está com um mensageiro “emperrado”, e se liga no sítio A do ribossomo e então doa a alanina para a cadeia polipeptídica nascente, numa reação normal de “transpeptidação”, e depois atua como um RNA mensageiro que codifica um peptídeo marcado (etiqueta). O ribossomo traduz esta região unindo a etiqueta codificada ao C-terminal da proteína inacabada (Karzai *et al.*, 2000; Gillet & Felden, 2001; Hong *et al.*, 2005). Quando o tmRNA faz essa transferência de alanina e codifica um peptídeo marcado, o sistema ribossomal volta a funcionar normalmente, ou seja, a proteína antes inacabada recebe um peptídeo sinal dando continuidade à tradução e então o sítio antes ocupado por ela é liberado e a proteína agora marcada é liberada e será reconhecida por proteases. Sugere-se que o tmRNA esteja relacionado com a

regulação da expressão gênica e promove um mecanismo altamente controlado para a tradução (Hong *et al.*, 2005). No presente trabalho o que pudemos verificar é que o gene XAC1511, codificador de tmRNA, envolvido com a síntese protéica, foi reprimido a partir de 20 horas de interação com o meio XAM1 até cinco dias de contato com a planta hospedeira. Cabe ressaltar que o gene XAC2111, já mencionado anteriormente, e que codifica a enzima ribonuclease E também foi reprimido. Este resultado corrobora os resultados obtidos para o gene XAC1511, tendo em vista que uma das enzimas requeridas para o processamento do tmRNA é a ribonuclease E. Embora este tmRNA esteja envolvido com a “reciclagem” de ribossomos e degradação de proteínas não funcionais, o presente estudo nos indicou redução destas funções desempenhadas pelo tmRNA. Se o metabolismo basal de síntese de DNA, RNA assim como de tradução estão diminuídos, provavelmente os ribossomos da célula sejam o suficiente para as sínteses requeridas durante este período de infecção, sugerindo uma não necessidade de imediato na reciclagem de ribossomos que poderiam estar “emperrados”, o que levaria a poupar energias que seriam necessárias para esta função, desviando-as talvez para outras funções mais essenciais como as de invasão e patogenicidade e virulência durante a interação *Xac*::planta cítrica.

Levando-se em conta que o controle do experimento corresponde à bactéria cultivada em meio de cultura Caldo Nutriente (meio rico), na comparação com a bactéria cultivada em condições de restrição nutricional representadas pelo meio indutor XAM1 ou em planta, os resultados obtidos sugerem que o metabolismo basal de ácidos nucléicos (síntese de nucleotídeos, replicação e transcrição) encontra-se mais ativado na situação de abundância de nutrientes. Ao se instalar nos espaços intercelulares do vegetal, a bactéria tem que executar um programa adaptativo ao ambiente em que se

encontra, o que deve levar a uma multiplicação mais lenta quando comparado com o seu desenvolvimento em meio de cultura rico.

5.5.3.8 Transportadores de Membrana

O transporte de substâncias através da membrana é sabidamente necessário para a manutenção da homeostase da célula, permitindo a captação de nutrientes e íons essenciais, excreção de produtos finais do metabolismo e substâncias deletérias, e a comunicação entre as células no meio em que se encontra. Este eficiente sistema de transporte é consequência do ancoramento ou ligação de proteínas na membrana plasmática, que especificamente reconhecem os diferentes tipos de substâncias transportadas para dentro ou para fora da célula. Em alguns casos esses compostos transitam através da membrana às expensas de energia na forma de ATP, contra um gradiente de concentração, carga elétrica, ou ambos (Pao *et al.*, 1998; Lehninger, 2002).

Duas grandes famílias de transportadores são descritas na literatura, a superfamília ABC (“ATP-Binding Cassete”) e a MFS (“Major Facilitator Superfamily”), também conhecida como família “uniporter-simporter-antiporter”. Os transportadores ABC são proteínas que utilizam a energia de hidrólise do ATP para bombear determinados tipos de substratos (pequenas moléculas e macromoléculas) através da membrana, contra um gradiente de concentração. Os transportadores MFS são capazes de transportar apenas pequenos solutos em resposta ao gradiente quimiosmótico (Pao *et al.*, 1998).

Muitos trabalhos em microrganismos patogênicos relatam a importância das proteínas transportadoras de membrana (famílias ABC e MFS) no efluxo de substâncias tóxicas à célula, protegendo o patógeno contra estes compostos (Vermeulen *et al.*, 2001;

Stergiopoulos *et al.*, 2002; Schoonbeek *et al.*, 2003; Zwiers *et al.*, 2003). Entretanto, esse sistema de transportadores também está envolvido com o influxo de um grande número de moléculas biológicas, incluindo açúcares, lipídios e polissacarídeos dentre outras substâncias.

O Banco de Dados TCDB (“Transport Classification DataBase”, <http://www.tcdb.org>) possui um sistema de classificação para todas as proteínas transportadoras de membrana, conhecido como sistema TC (“Transport Classification”). Este sistema é análogo ao sistema EC (Enzyme Commission) para classificação das enzimas. Os resultados obtidos na interação da *Xac* com a planta hospedeira revelou 5 genes relacionados a transportadores de membrana que tiveram sua expressão reprimida (**Tabela 13**).

Tabela 13. Expressão diferencial e temporal de genes relacionados a transportadores de membrana.

GENE	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECCÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i.	5 d.a.i.			
XAC3171	-2,78	-2,29	-1,91	-1,74	antiporter cátion:próton	TTCGn...N15...TTCGn	I
XAC4292	-2,21	-1,61		-0,96	transportador de benzoato	TTCGn...N15...TTCGn	461
XAC0317		-1,20	-0,98	-1,08	transportador MFS da família YNFM	TTCGn...N15...TTCGn	I
XAC2971		-0,77	-0,65		proteína ligante de ATP de transportador ABC	TTCGn...N15...TTCGn	I
XAC3601		-0,67	-0,62	-0,83	permease de transportador ABC	nCGAA...N15...nCGAA	I

¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação. Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de repressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC3171 codifica uma proteína transportadora da família CPA2, tipo cation-próton antiporter (TC 2.A.37), com 12 regiões transmembranares (PSORT) na porção N-terminal e uma grande região citoplasmática na extremidade C-terminal da proteína. Esta proteína (565 aminoácidos), em particular, está envolvida com o transporte de íons de sódio (+) para dentro da célula e íons de hidrogênio (+) para fora assim como o reverso da reação. Esta proteína deve estar relacionada com ajustes no pH fisiológico da célula.

O gene XAC4292 é uma proteína de membrana transportadora de benzoato, com 392 aminoácidos (TC 2.A.46). Esta proteína contém 13 regiões transmembranares. Este transporte pode acontecer em ambas as direções, tanto para dentro como para fora da célula. Não está clara a função deste transportador em células bacterianas, entretanto, como este composto também é antimicrobiano, a *Xac* provavelmente tentar fazer o efluxo destes compostos quando sentir necessidade. Por outro lado a bactéria *Pseudomonas putida*, ao perceber a presença de benzoato, ativa a expressão de genes codificadores de enzimas degradativas de benzoato, convertendo este composto à catecol, o qual também será metabolizado e utilizado como fonte de energia (Cowles *et al.*, 2000). Entretanto, no presente estudo o gene XAC4292 mostrou-se reprimido no contato com o meio indutor XAM1 ou na interação com a planta cítrica (**Tabela 13**), o que nos indica que este composto, benzoato, provavelmente não esteja em abundância no ambiente em que a *Xac* se encontra.

O gene XAC0317 (453 aminoácidos) codifica uma proteína transportadora de membrana da família YNFM (TC 2.A.1.36.1). Esta família caracteriza proteínas sensíveis à acriflavina (antimicrobiano). Entretanto, de acordo com as informações contidas no NCBI e Pfam (“Protein families database of alignments”) esta proteína contém domínio de transporte de açúcares. A referida proteína codificada pelo gene

XAC0317 possui 10 regiões transmembranares. O gene XAC0317 da *Xac* foi reprimido em 20 horas de contato com o meio XAM1 até cinco dias de interação com o hospedeiro. Este resultado nos leva a interpretar que, ou a acriflavina não está presente nessas condições referidas acima, ou não está havendo transporte de algum tipo específico de açúcar.

O gene XAC2971 codifica uma proteína citoplasmática de 239 aminoácidos ligante de ATP do complexo transportador ABC (TC 3.A.1). Geralmente cada família tem especificidade a um substrato, entretanto, no TCDB não há informações mais detalhadas para a proteína codificada pelo gene XAC2971. Diante disso o que podemos deduzir é que esta proteína se liga ao ATP favorecendo o transporte de moléculas, sendo que exclusivamente nos tempos de 20 horas e 3 dias de interação com o hospedeiro ela não está sendo sintetizada (**Tabela 13**). Uma explicação para a repressão do gene XAC2971 nestes tempos seria a não necessidade temporal desta proteína.

O gene XAC3601, que codifica uma permease de transportador ABC tipo 2 (TC 3.A.1.211.3), também foi reprimido nos tempos de 20 horas de contato com o meio indutor XAM1 até o final da cinética de infecção em folhas de laranjeira (**Tabela 13**). Esta proteína (260 aminoácidos) contém 6 domínios transmembrânicos e, de acordo com o banco TCDB, ela está relacionada com a bomba de efluxo multidrogas. Diante desses resultados, lançamos a hipótese de que a proteína ligante ao ATP e a permease de transportador ABC, codificadas pelos genes XAC2971 e XAC3601, respectivamente, interagem constituindo parte do sistema de transportadores ABC para um determinado substrato. Esta hipótese poderia ser testada em ensaios de interação proteína-proteína em levedura através do sistema de duplo híbrido.

É possível que a repressão observada para esses genes que codificam componentes relacionados com transporte de substâncias esteja relacionada com a

mudança de ambiente entre a *Xac* em meio rico CN e na condição de início da interação com o ambiente vegetal. Não podemos excluir a hipótese de que estes genes possam ser ativados durante a etapa necrótica da doença (após 5 dias de infecção), quando a degradação massiva de compostos da célula vegetal, e eventual lise desta, pode levar à geração de substâncias tóxicas ao patógeno.

5.5.3.9 Metabolismo Energético

A respiração celular é uma via metabólica universal para o catabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos, resultando no fornecimento de energia. A respiração celular aeróbica consiste resumidamente de três estágios: a formação de acetil-coenzima A (acetil-CoA), o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons. Na primeira etapa, a acetil-CoA é formada a partir de carboidratos (glicólise), de gorduras (oxidação) ou de aminoácidos (oxidação). No ciclo de Krebs os grupos acetil da acetil-CoA são oxidados enzimaticamente até CO_2 , de maneira que a energia é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase) e FADH_2 (flavina adenina dinucleotídeo desidrogenase). A cadeia transportadora de elétrons envolve a oxidação das coenzimas NADH e FADH_2 reduzidas e os elétrons liberados são conduzidos ao longo de uma cadeia de moléculas transportadoras até chegar ao aceptor final O_2 , com a formação de H_2O . Durante o transporte de elétrons grande quantidade de energia é liberada e armazenada na forma de ATP (adenosina trifosfato) (Lehninger, 2002).

No presente trabalho 5 genes relacionados com o metabolismo energético mostraram-se diferencialmente expressos (**Tabela 14**).

Tabela 14. Expressão diferencial e temporal de genes relacionados ao metabolismo energético.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC1535		-1,08			oxoglutarato desidrogenase	TTCGn...N15...TTCGn	221
XAC3447	-1,01	-1,65	-3,49	-2,99	proteína ThiC da biossíntese de tiamina	nCGAA...N15...nCGAA	26
XAC2727		-1,88	-1,52	-2,11	proteína possivelmente da família SCO1/SenC*	TTCGC...N16...TTCG G	883
XAC3887		-1,31	-1,62	-0,99	subunidade I da citocromo C oxidase	TTCGn...N15...TTCGn	I
XAC3521			1,24		nicotinato fosforibosiltransferase	nCGAA...N15...nCGAA	I

*Proteína reanotada; ¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Os valores positivos correspondem à indução gênica e os valores negativos referem-se à repressão gênica, e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC3447 codifica a proteína ThiC relacionada com a biossíntese de tiamina (625 aminoácidos), e foi reprimido durante toda a cinética de infecção (**Tabela 14**). A tiamina, na forma de tiamina difosfato (TPP) é uma coenzima requerida por várias enzimas metabólicas. Uma dessas enzimas é a piruvato descarboxilase, responsável pela conversão do piruvato derivado da glicólise em acetil-CoA, substrato do ciclo de Krebs. A diminuição de TPP na célula deve resultar, entre outras coisas, na diminuição da produção de acetil-CoA e conseqüente redução da respiração celular.

A XAC1535 codifica a enzima oxoglutarato desidrogenase ou α -cetoglutarato desidrogenase (EC 1.2.4.2), uma proteína de 968 aminoácidos. Este gene foi reprimido em 20 horas de cultivo da *Xac* no meio XAM1 (**Tabela 14**). A enzima oxoglutarato desidrogenase faz parte de um complexo de descarboxilação oxidativa no ciclo de

Krebs. Este complexo é constituído por três enzimas: dihidrolipoil desidrogenase, dihidrolipoil succiniltransferase e a oxoglutarato desidrogenase. A oxoglutarato desidrogenase, juntamente com as outras duas enzimas do complexo, converte o oxoglutarato ou α -cetoglutarato em succinil-CoA + CO₂, formando também um NADH que servirá como substrato para a cadeia respiratória. Nesta fase de descaboxilação oxidativa, além do complexo enzimático, a TPP também é requerida como cofator para a enzima oxoglutarato desidrogenase, numa segunda via. Se o gene que codifica a enzima oxoglutarato desidrogenase mostrou-se reprimido em todos os tempos da infecção, isto nos sugere novamente que o metabolismo energético da *Xac* também foi reduzido no estágio infectante, quando comparado com a bactéria cultivada em meio rico.

Dois genes diretamente relacionados com a cadeia de transporte de elétrons também foram reprimidos, a XAC2727 e a XAC3887 (**Tabela 14**). A XAC2727, anteriormente anotada como hipotética, foi reanotada no presente trabalho como codificador de uma coenzima (197 aminoácidos) da família SCO1/SenC. Esta família está relacionada à cadeia transportadora de elétrons. De acordo com informações contidas no Banco de Dados InterPro (“database of protein families”), em levedura, a proteína SCO1 é necessária, especificamente, em um passo pós-traducional, no acúmulo de subunidades I e II da citocromo C oxidase. O gene que participa desta via descrita acima foi reprimido desde 20 horas de contato com o meio indutor até cinco dias de interação com a planta hospedeira (**Tabela 14**). Isto nos leva à interpretação de que as subunidades I e II da citocromo C oxidase foi reduzida, e em última análise resultando na diminuição da atividade da cadeia respiratória da *Xac*. O gene XAC3887, que também foi reprimido nos mesmos tempos verificados para XAC2727 (**Tabela 14**), codifica justamente a subunidade I da enzima citocromo C oxidase (EC 1.9.3.1) da

cadeia transportadora de elétrons. Esta enzima (535 aminoácidos) encontra-se no passo final da cadeia respiratória, transportando dois elétrons do citocromo c para o oxigênio e reduzindo-o a H₂O. Este resultado também é um indicativo de que a *Xac* reduziu seu metabolismo energético.

O gene XAC3521 codifica a enzima nicotinato fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.11), de 392 aminoácidos, e foi induzido aos três dias de interação com a planta hospedeira (**Tabela 14**). Esta enzima está envolvida na via metabólica de nicotinato e nicotinamida. A nicotinato fosforibosiltransferase tem como substrato o nicotinato D-ribonucleosídeo, produzindo nicotinato ou nicotinato D-ribonucleotídeo, que é um dos precursores da via de biossíntese da nicotinamida. O nicotinato é um dos precursores do NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e do NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Portanto este gene está envolvido com a biossíntese de coenzimas que participam na cadeia transportadora de elétrons. Embora vários outros genes relacionados com a cadeia respiratória apresentaram-se reprimidos, o gene XAC3521, em particular, parece assumir a função de manutenção do funcionamento da cadeia respiratória da *Xac* para um momento específico da infecção.

De acordo com resultados obtidos neste trabalho, genes que codificam componentes da cadeia do metabolismo energético foram reprimidos, e apenas um gene mostrou-se induzido em um momento da infecção, o que nos permite uma interpretação de que o metabolismo bioenergético da bactéria no estágio infectante seja menor que o da bactéria cultivada em meio rico CN.

5.5.3.10 Resposta ao Estresse Ambiental

Durante o estabelecimento da interação do patógeno com a planta hospedeira, todo um mecanismo de interação é acionado envolvendo um sistema de ataque e defesa com um sistema de contra-ataque. De um lado a planta, ao detectar o agente biopatogênico, procura ativar seu sistema de resistência geral contra patógenos, enquanto o invasor busca superar as estratégias de defesa da planta (Stahl & Bishop, 2000). Ao perceber a presença do patógeno a planta produz substâncias nocivas à bactéria invasora. No contra-ataque o fitopatógeno é capaz de expressar proteínas relacionadas a estresses, dentre as quais encontramos as proteínas de choque térmico ou Hsp (“Heat shock proteins”), nomeadas assim porque a sua expressão foi originalmente associada a mudanças de temperatura (choque térmico). Entretanto, atualmente uma variedade de estresses ambientais são percebidos pelas Hsp. Em geral, as células respondem a situações de estresse (agentes físicos ou químicos potencialmente prejudiciais) através da expressão acentuada de proteínas Hsp. As Hsp são proteínas chaperonas e sua nomenclatura relaciona-se com os respectivos pesos moleculares, por exemplo, Hsp70 tem aproximadamente 70 kDa, Hsp90 tem aproximadamente 90 kDa.

No presente estudo pudemos observar que um gene que codifica uma proteína de choque térmico foi diferencialmente expresso durante a cinética de infecção (**Tabela 15**).

Tabela 15. Expressão diferencial e temporal de gene relacionado a resposta ao estresse ambiental.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC2528	1,25			-0,70	proteína de choque térmico Hsp90	TTCGn...N15...TTCGn	I

¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão do gene (valor de M, Smyth, 2005), no referido tempo de infecção. O valor positivo corresponde à indução gênica e o valor negativo refere-se à repressão gênica e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC2528, codificador de uma proteína citoplasmática de choque térmico Hsp90 (634 aminoácidos), apresentou-se induzido logo no início da cinética de infecção, em 12 horas de contato com o meio indutor XAM1, e foi reprimido aos 5 dias de contato com a planta hospedeira (**Tabela 15**). A família das Hsp90 abrange proteínas que se apresentam altamente conservadas em quase todas as células e são encontradas abundantemente inclusive em condições normais e estão associadas a diversas outras proteínas (Lindquist & Craig, 1988). Entretanto pudemos observar uma variação na expressão do gene que codifica a proteína Hsp90, o que nos levar a inferir que este gene está respondendo a mudanças ambientais percebidas nos tempos de 12 horas de contato com o meio indutor e cinco dias de interação com a planta hospedeira (**Tabela 15**). Estes resultados corroboram os relatos da literatura, uma vez que no início do processo infeccioso presume-se que o ambiente apoplástico da planta (nutricionalmente pobre),

somado às possíveis substâncias tóxicas liberadas pela célula vegetal, represente uma situação de estresse ambiental ao patógeno, levando à indução da expressão do gene codificador de Hsp. Já aos 5 dias, momento este da infecção em que o metabolismo da bactéria *Xac* já deve estar adaptado para aquela situação, parece não ser mais necessário a expressão do referido gene.

5.5.3.11 Proteínas Putativamente Secretadas

O repertório de proteínas secretadas pelo patógeno na interação com seu hospedeiro compreende toxinas, proteases, lipases, enzimas pécticas e celulasas, capazes de conferir virulência ou mesmo resistência contra determinados compostos tóxicos produzidos pela planta. Em *Xac* os sistemas de secreção tipo II, III e IV estão envolvidos com a secreção de toxinas e fatores de patogenicidade e virulência.

Verificamos a expressão diferencial de três genes (anteriormente anotados como hipotéticos) codificadores de proteínas putativamente secretadas por possuírem um peptídeo sinal na porção N-terminal, sendo eles XAC2370, XAC1162 e XAC1163 (**Tabela 16**).

Tabela 16. Expressão diferencial e temporal de genes codificadores de putativas proteínas secretadas.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC2370		1,29	2,13	2,49	proteína putativamente secretada*	TTCGn...N15...TTCGn	227
XAC1162		-0,67	-0,89	-1,01	proteína putativamente secretada*	TTCGn...N15...TTCGn	I
XAC1163	-1,09				proteína putativamente secretada *	TTCGn...N15...TTCGn	517

*Reanotada; ¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Os valores positivos correspondem à indução gênica e os valores negativos referem-se à repressão gênica, e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC2370 foi induzido a partir de 20 horas de contato com o meio XAM1, seguindo aumento na expressão em 3 e 5 dias de interação com a planta cítrica. Este resultado parece ser um indicativo da importância desta proteína (342 aminoácidos) durante o processo infeccioso, embora a reanotação desta ORF (neste estudo) não traga indícios quanto à sua função específica. XAC1162 codifica uma proteína de 349 aminoácidos e o gene XAC1163 codifica uma outra proteína putativa de 225 aminoácidos. A proteína resultante da expressão do gene XAC2370 foi requisitada em momentos mais tardios da interação, enquanto a proteína codificada pelo gene XAC1162 possivelmente tenha sido expressa em tempos mais precoces (antes de 12 horas da interação) e, por conseguinte, não detectada neste estudo, visto que em 12 horas de cultivo da bactéria no meio XAM1 a expressão do gene XAC1162 não diferiu de sua expressão quando cultivada em meio CN, e em seguida o gene começou a ser reprimido (20 horas até 5 dias). Já o gene XAC1163 foi reprimido em 12 horas da

interação com o meio indutivo XAM1, voltando a ter a mesma expressão verificada quando a bactéria foi cultivada em meio rico CN. Embora a função dessas proteínas não tenha sido definida até o momento, a presença de peptídeo sinal predito por bioinformática sugere tratar-se de proteínas secretadas, sendo que duas delas (XAC2370 e XAC1163) possuem “PIP box” a 5’ da metionina. É possível supor que essas proteínas respondem à presença da planta hospedeira ou de meio que mimetiza o espaço apoplástico da planta, o que sugere serem candidatas a proteínas secretadas pelo sistema de secreção tipo II. Estas suposições nos levam, em última análise, a inferir que a expressão de proteínas secretadas pelo sistema tipo II também poderia ser regulada via “PIP box”.

5.5.3.12 Hipotéticas

Aproximadamente 16% (11 genes) dos 67 genes diferencialmente expressos (**Tabela 17**) não apresentaram homologia com seqüências depositadas no centro de dados público mundial (GenBank – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Essa falta de informação sobre as 16 proteínas codificadas pelos genes da *Xac* que foram diferencialmente expressos no estágio infectante, torna-as candidatas a estudos mais investigativos a respeito de suas funções, tendo em vista ainda que 7 dos 11 genes apresentam “PIP box” putativos a 5’ da metionina inicial (**Tabela 17**) e, portanto, podem estar respondendo ao contato com a planta hospedeira.

Tabela 17. Expressão diferencial e temporal de genes codificadores de proteínas hipotéticas.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC0315		1,13	0,88	0,79	Proteína hipotética	TTCGC...N16...TTCGG	663
XAC2902			1,12	1,19	Proteína hipotética conservada	GCGAA...N16..GCGAA	I
XAC1223	-2,80				Proteína hipotética conservada	nCGAA...N15...nCGAA	768
XAC1536		-1,41	-1,38	-1,31	Proteína hipotética conservada	nCGAA...N15...nCGAA	I
XAC2827		-0,97	-1,89	-1,56	Proteína hipotética conservada	nCGAA...N15...nCGAA	820
XAC3933			-1,93		Proteína hipotética conservada	TTCGn...N15...TTCGn	I
XAC1508			-1,16	-0,80	Proteína hipotética	GCGAA...N16..GCGAA	I
XAC1563		-0,86		-0,81	Proteína hipotética	nCGAA...N15...nCGAA	463
XAC1566		-1,96		-1,50	Proteína hipotética	GCGAA...N16..GCGAA	546
XAC1817			-1,05	-0,93	Proteína hipotética	TTCGn...N15...TTCGn	940
XAC2490			-1,84	-1,73	Proteína hipotética conservada em <i>Xanthomonas</i>	TTCGn...N15...TTCGn	759

¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Os valores positivos correspondem à indução gênica e os valores negativos referem-se à repressão gênica, e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

5.5.3.13 Outros genes diferencialmente expressos

Além dos genes já mencionados anteriormente e que foram agrupados em classes funcionais, outros seis genes mostraram diferenças na expressão durante a interação da *Xac* com o meio indutor XAM1 e/ou com a planta hospedeira. Estes genes estão apresentados na **Tabela 18**.

Tabela 18. Expressão diferencial e temporal de genes da *Xac*.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico	Consenso do “PIP”	Distância do “PIP”
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.			
XAC2828	0,92				proteína possivelmente de membrana*	nCGAA...N15...nCGAA	I
XAC1298	0,67				reguladora transcricional	TTCGn...N15...TTCGn	I
XAC3446	-1,39		-3,39	-2,55	proteína possivelmente reguladora *	nCGAA...N15...nCGAA	I
XAC3309			-1,36	-1,46	aminopeptidase	TTCGn...N15...TTCGn	63
XAC3677			1,57	1,50	hidrolase da superfamília HAD *	nCGAA...N15...nCGAA	I

*Reanotada; ¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene (valor de M, Smyth, 2005) no referido tempo de infecção. Os valores positivos correspondem à indução gênica e os valores negativos referem-se à repressão gênica, e nos locais onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente. A coluna Distância do “PIP” apresenta a que distância o “PIP box” se encontra do início do gene, e I indica que o “PIP box” se encontra internamente na ORF.

O gene XAC2828 codifica uma proteína possivelmente de membrana (138 aminoácidos), sendo que anteriormente encontrava-se na categoria de proteínas hipotética. De acordo com a predição do PSORT esta proteína contém quatro domínios transmembrânicos, o que pressupõe que ela seja realmente de membrana. O gene codificador desta proteína foi induzido em 12 horas de contato com o meio indutor XAM1 (**Tabela 18**), o que nos levar a supor que o produto gênico tenha alguma função específica para este tempo na cinética de infecção.

XAC1298 codifica uma proteína citoplasmática relacionada à regulação de transcrição (231 aminoácidos), e que por sua vez também mostrou-se induzido em 12 horas de interação com o meio XAM1 (**Tabela 18**). Embora não haja maiores informações a respeito desta proteína, podemos sugerir a importância deste fator na

regulação transcricional de genes especificamente requisitados no início da infecção da *Xac*.

O gene XAC3446 codifica uma proteína de 784 aminoácidos, possivelmente reguladora.. Esta proteína foi anotada anteriormente como hipotética. De acordo com a predição do programa PSORT, trata-se de uma proteína transmembrânica ancorada na membrana interna. O gene codificador desta proteína reguladora foi reprimido em 12 horas de contato com o meio indutor e em três e cinco dias de interação com a folha de laranjeira (**Tabela 18**). Este resultado aponta uma regulação positiva ou negativa para genes controlados por este regulador durante a cinética de infecção.

O gene XAC3309 codifica a enzima aminopeptidase (472 aminoácidos) e foi reprimido aos três e cinco dias de contato com a planta hospedeira (**Tabela 18**). Aminopeptidases em geral hidrolisam ligações entre aminoácidos em peptídeos. Entretanto não há informações mais detalhadas a respeito de qual peptídeo ela reconheça. Diante disso podemos deduzir apenas que esta função de peptidase para algum tipo de ligações peptídicas não foi requerida nos tempos de três e cinco dias de interação *Xac*::hospedeiro.

Já o gene XAC3677 codifica uma proteína citoplasmática de 226 aminoácidos. Esta proteína também foi anotada anteriormente como hipotética e reanotada no presente estudo como uma hidrolase da superfamília HAD (“Haloacid Dehalogenase”). O gene XAC3677 mostrou-se induzido em três e cinco dias após a interação com a planta hospedeira (**Tabela 18**). De acordo com informações contidas no InterPro, esta família de hidrolase participa de dois tipos de reações: fosfonoacetaldeído hidrolase (via de degradação de fosfonatos) e pirimidina 5-nucleotidase (biossíntese de pirimidina). A fosfonoacetaldeído hidrolase (uma fosfonatase) cataliza a hidrólise do fosfonoacetaldeído para acetaldeído e fosfato inorgânico, disponibilizando fósforo na

forma utilizável pela bactéria. Sabendo-se que compostos fosfonatos são utilizados como agentes antibacterianos, fungicidas, pesticidas, herbicidas e antivirais (Morais *et al.*, 2000), podemos supor que a planta, na situação de contra-ataque, possa estar liberando este composto fosfonato (fosfonoacetaldeído) prejudicial à *Xac*, enquanto o fitopatógeno, por outro lado, possa estar utilizando este composto a seu favor através da via de degradação de fosfonatos, resultando em acetaldeído e fósforo inorgânico. Em levedura foi verificado que hidrolase da superfamília HAD está presente na via de pirimidina 5-nucleotidase, fazendo parte portanto da biossíntese de pirimidina. Em *Xac* esta enzima da superfamília HAD poderia estar associada a uma ou outra das reações citadas acima. Podemos deduzir que esta enzima, em *Xac*, poderia estar relacionada tanto com a degradação de fosfonatos (compostos tóxicos para a bactéria) liberando fosfato inorgânico, quanto à indução de seu metabolismo de pirimidina, que são precursores para biossíntese de ácidos nucleicos.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram evidenciar genes contendo elementos do tipo “PIP-box” e diferencialmente expressos, “up” ou “down” regulados, quando a *Xac* teve ativado, “in vitro” ou “in vivo”, seus mecanismos de patogenicidade e virulência.

Em *Ralstonia solanacearum* foi caracterizado o motivo conservado hrp_{II} box através de análise estrutural de promotores de genes *hrp*, que são regulados pelo ativador transcricional HrpB (homólogo a HrpX em *Xanthomonas*) (Cunnac *et al.*, 2004a). Estudo recente de expressão gênica, realizado por Occhialini *et al.* (2005), utilizando um microarranjo do genoma do fitopatógeno *R. solanacearum*, identificou mais de 100 genes cuja expressão foi dependente de HrpB, sendo que cerca de 70 genes foram “up” regulados e 50 “down” regulados via *hrpB*. Neste trabalho Occhialini *et al.* (2005) relatam pela primeira vez que *hrpB* atua não somente promovendo a indução da

expressão de genes controlados por este elemento, mas também como um regulador negativo, ou seja, reprimindo a expressão de alguns genes. Além disso, também foi demonstrado pela primeira vez que genes codificadores de outras proteínas não relacionadas ao SSTT são regulados via *hrpB*.

No trabalho de Astua-Monge *et al.* (2005), o perfil de expressão de 279 genes de *Xac* (isolado 306) foi investigado através da técnica de macroarranjo. Baseados nos dados de anotação do genoma da *Xac* 306, os autores escolheram genes supostamente relacionados com a patogenicidade e virulência com o intuito de comparar o perfil de expressão dos mesmos em resposta a duas condições: *Xac* cultivada por 12 horas em meio de cultura CN e cultivada por 20 horas no meio indutor XVM2, a 28°C. Os autores encontraram 38 genes diferencialmente expressos, sendo que 31 genes mostraram-se induzidos e 7 genes foram reprimidos. Quando comparado com os nossos dados (este trabalho), verificamos que apenas 10 genes tiveram o perfil de expressão avaliado por ambos os grupos, sendo que destes 10 genes apenas 2 mostraram-se diferencialmente expressos nos dois trabalhos, sendo eles XAC1816 e XAC0618. Enquanto o gene XAC1816 (proteína relacionada à hemaglutitina/hemolisina) mostrou-se induzido quando Astua-Monge *et al.* (2005) analisaram a *Xac* cultivada por 20 horas em meio XVM2, nossos dados indicam repressão de sua expressão aos 5 dias após a inoculação, sem ocorrência de indução nas fases iniciais analisadas (12 e 20 horas em meio de indução e 3 dias “in planta”). Por outro lado, o gene XAC0618 (relacionado com a biossíntese de glucano periplasmático) foi reprimido após 20 horas de cultivo em meio XVM2 no trabalho de Astua-Monge *et al.* (2005), enquanto em nosso trabalho verificamos que este gene mostrou-se induzido após 20 horas de cultivo no meio indutor XAM1 e também aos 3 e 5 dias de multiplicação da *Xac* na planta hospedeira. O meio sintético XVM2 utilizado por Astua-Monge *et al.* (2005) é um meio sabidamente

indutor de genes *hrp* em *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) (Wengelnik *et al.*, 1996b), sendo que cada patovar de *Xanthomonas* pode ter suas particularidades no que diz respeito a interação com seu hospedeiro específico. Em função disso, para cada fitopatógeno seria recomendável realizar modificações no meio de cultura XVM2, descrito inicialmente como indutor de genes relacionados à patogenicidade e virulência em *Xcv*, para se obter o meio mais adequado que simulasse as condições intracelulares da sua planta hospedeira. Neste sentido, Tsuge *et al.* (2002) desenvolveram o meio XOM2, a partir de modificações do meio XVM2, obtendo um meio indutor de genes *hrp* em *X. oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). No presente trabalho, utilizamos um meio indutor, que designamos de XAM1, a partir de modificações realizadas no meio XVM2 e que, em experimentos anteriores, mostrou ser um melhor indutor de genes *hrp* em *Xac* quando comparado com o meio XVM2 (White, F.F., comunicação pessoal). Diante desses resultados contrastantes, deduzimos que a *Xac* possa ter percebido de maneira distinta o ambiente representado pelos meios XVM2 e XAM1. Acreditamos que o meio XAM1 representa um meio de cultura mais específico para *Xac* quanto à simulação das condições de indução conferida pelo hospedeiro cítrico do que o meio XVM2 utilizado usualmente para *Xcv*. Além disso, no presente trabalho verificamos a expressão de genes da *Xac* também “in planta”, condição esta não analisada por Astua-Monge *et al.* (2005).

Os resultados obtidos no presente estudo de expressão gênica em *Xac*, em que foram utilizados genes contendo promotores putativos do tipo “PIP box” na região promotora ou internamente na ORF codificadora, revelaram tanto genes que foram regulados positivamente (dentre os quais genes do SSTT), como genes que foram regulados negativamente quando a bactéria está na presença do hospedeiro compatível ou meio de cultura que simule o hospedeiro. Neste sentido os dados corroboram os

resultados descritos recentemente por Occhialini *et al.* (2005) em *Ralstonia solanacearum*, que foi o primeiro trabalho a descrever genes relacionados a patogenicidade, pertencentes ou não ao SSTT, sendo reprimidos pelo ativador de transcrição HrpB.

Os microarranjos, assim como os macroarranjos, são técnicas de investigação de expressão gênica em larga escala e de caráter exploratório. Entretanto, algumas variáveis são capazes de interferir nos resultados obtidos (eficiência e qualidade da extração do RNA, síntese das sondas de cDNA, hibridação das membranas, análise estatística dos dados, dentre outros) e, em função disso, torna-se necessária a validação dos resultados obtidos por essas técnicas. Assim, para validar os resultados de macroarranjo obtidos no presente trabalho foram escolhidos alguns genes que se mostraram diferencialmente expressos por essa técnica e verificou-se a expressão dos mesmos através da técnica de RT-PCR semi-quantitativa.

5.6 Validação do Macroarranjo Através de RT-PCR Semi-quantitativa

A validação de 3 genes (XAC0398, XAC0416 e XAC2370) detectados como diferencialmente expressos no macroarranjo foi realizada por RT-PCR semi-quantitativa, segundo metodologia descrita no item 3.15 de Material e Métodos. Os resultados obtidos podem ser vistos nas **Figuras 25 a 31**.

Como mencionado em Material e Métodos (item 3.15.1), os mesmos RNAs tratados com DNase utilizados nas reações de RT-PCR semi-quantitativa foram também submetidos a uma reação de PCR utilizando a enzima “Taq polimerase” e os mesmos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR. Os resultados obtidos ao final de 35 ciclos de PCR não mostraram nenhuma amplificação após corrida eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídeo (dados não mostrados), indicando que o tratamento de DNase foi eficiente para eliminar possíveis contaminantes de DNA nas amostras. Estes resultados conferem alto grau de confiabilidade aos resultados de amplificações obtidos nas RT-PCR semi-quantitativas.

Com o intuito de quantificar os resultados das autorradiografias, as mesmas foram submetidas à análise densitométrica num equipamento Shimadzu como descrito em Material e Métodos. Embora todas as autorradiografias tenham sido submetidas à análise densitométrica, apresentamos apenas o resultado de uma das autorradiografias (**Figura 26**) para a sonda XAC0398 (ORF codificadora da proteína HrpD6). Os valores gerados pelo densitômetro, correspondentes às áreas, foram exportados para uma planilha de Excel, permitindo desta forma construir figuras que ilustrassem as quantificações das áreas hibridadas nas diferentes condições experimentais, para os três genes submetidos à validação, assim como, para o gene de expressão constitutiva (rDNA16S). Estes resultados estão apresentados nas **Figuras 27, 29, 31 e 33**.

Figura 25. RT-PCR semi-quantitativa da ORF XAC0398 (A). Gel de agarose 1,2% contendo 25 μ L do produto da RT-PCR. Colunas 1 a 6 correspondem a *Xac* nas diferentes condições, sendo 1) cultivada em meio CN; 2) cultivada por 12 horas em meio XAM1; 3) cultivada por 20 horas em meio XAM1; 4) exsudado de folhas após 3 dias da inoculação; 5) exsudado de folhas após 5 dias da inoculação e 6) controle negativo da reação. (B) Sonda da ORF XAC0398 purificada. A sonda (coluna 1) foi marcada e utilizada na hibridação da membrana. (C) “Southern blot” revelado em filme de Raio X. Colunas 1 a 6 correspondem às mesmas condições descritas em A. M corresponde ao marcador de peso molecular (Ladder de 1 Kb da Invitrogen).

Figura 26. Traçado densitométrico da autorradiografia gerado pelo densitômetro. A autorradiografia apresentada na Figura 25C, referente à RT-PCR semi-quantitativa da ORF XAC0398, foi submetida à densitometria como descrito em Material e Métodos. A) *Xac* cultivada em meio CN; B) *Xac* cultivada por 12 horas em meio XAM1; C) *Xac* cultivada por 20 horas em meio XAM1; D) *Xac* exsudada de folhas após 3 dias da inoculação; E) *Xac* exsudada de folhas após 5 dias da inoculação.

NDNão detectável

Figura 27. Área do traçado densitométrico da Figura 26.

Para uma melhor visualização da validação do macroarranjo apresentamos resumidamente os resultados do macroarranjo para os três genes submetidos à validação pela técnica de RT-PCR semi-quantitativa (**Tabela 19**).

Tabela 19. Genes diferencialmente expressos no macroarranjo e utilizados na validação por RT-PCR semi-quantitativa.

GENE ¹	EXPRESSÃO DIFERENCIAL NA CINÉTICA DE INFECÇÃO				Produto gênico
	12 horas	20 horas	3 d.a.i. ²	5 d.a.i.	
XAC0398	2,29	3,30	3,52	4,58	HrpD6
XAC0416	7,04	7,22	14,02	16,55	Hpa1
XAC2370		1,29	2,13	2,49	Proteína possivelmente secretada

¹ De acordo com a anotação do genoma da *Xac*; ²d.a.i. = dias após a inoculação.

Os valores encontrados nas colunas referentes à cinética de infecção correspondem aos níveis de expressão de cada gene no referido tempo de infecção (valor de M, Smyth, 2005). Os valores positivos correspondem à indução gênica, e no local onde não há valores indica que não houve diferença de expressão quando comparado ao cultivo da bactéria em meio Caldo Nutriente.

Ao analisarmos visualmente a **Figura 25**, “Southern blot” para o gene XAC0398 a partir de cDNA de *Xac*, observamos diferenças nas densidades das bandas geradas através desta técnica. Na coluna 1 (*Xac* cultivada em meio CN) praticamente não observamos sinal algum e começamos a visualizar sinal de hibridação na coluna 2 (*Xac* cultivada por 12 horas em meio XAM1), sendo que este sinal mostrou-se aumentado na coluna 3 (*Xac* cultivada por 20 horas em meio XAM1). Já as colunas 4 e 5 (exsudado de folhas aos 3 e 5 dias após a inoculação, respectivamente) mostram sinais bastante semelhante sendo estes mais volumosos que os visualizados nas condições anteriores. Estes resultados são similares aos encontrados no macroarranjo (**Tabela 19**). Através da visualização desta autorradiografia (**Figura 25**), a coluna 4 (*Xac* exsudada 3 dias após a inoculação) mostra-se com uma banda mais volumosa que a que se encontra na coluna 3 (*Xac* cultivada por 20 horas em meio XAM1), entretanto, quando analisadas por densitometria (**Figuras 26 e 27**) verificamos que a densidade da banda hibridada correspondente à *Xac* exsudada no terceiro dia após a inoculação (área D da **Figura 26** e condição experimental de 3 dias após a inoculação na **Figura 27**) é ligeiramente menor que a densidade da banda correspondente à *Xac* cultivada por 20 horas em meio XAM1. Exceto essa pequena discrepância, os resultados estão de acordo como o observado no macroarranjo (**Tabela 19**).

Figura 28. RT-PCR semi-quantitativa da ORF XAC0416 (A). Gel de agarose 1,2 % contendo 25 uL do produto da RT-PCR. Colunas 1 a 6 correspondem a *Xac* nas diferentes condições, sendo 1) cultivada em meio CN; 2) cultivada por 12 horas em meio XAM1; 3) cultivada por 20 horas em meio XAM1; 4) exsudado de folhas após 3 dias da inoculação; 5) exsudado de folhas após 5 dias da inoculação e 6) controle negativo da reação. (B) Sonda da ORF XAC0416 purificada. A sonda (coluna 1) foi marcada e utilizada na hibridação da membrana. (C) “Southern blot” revelado em filme de Raio X. Colunas 1 a 6 correspondem às mesmas condições descritas em A. M corresponde ao marcador de peso molecular (Ladder de 1 Kb da Invitrogen).

ND Não detectável

Figura 29. Área do traçado densitométrica da autorradiografia gerada pela hibridação da membrana de cDNA de *Xac* cultivadas em diferentes condições. A membrana foi hibridada com a sonda da ORF XAC0416 (Figura 28C).

As **Figuras 28 e 29** apresentam os resultados da RT-PCR semi-quantitativa para o gene XAC0416, codificador da proteína Hpa1. Essas Figuras mostram que quando a *Xac* se encontrava no meio de cultivo CN, este gene não teve sua expressão induzida, com conseqüente ausência de transcritos para esta ORF, em perfeita concordância com o resultado do macroarranjo (**Tabela 19**). Em 12 horas de cultivo da *Xac* no meio XAM1, este gene mostrou-se altamente induzido, sendo esta expressão alta

mantida após 20 horas em meio XAM1 e após 3 dias na planta hospedeira e aumentando ainda mais após 5 dias na planta hospedeira. Estes resultados concordam com os já observados no macroarranjo (**Tabela 19**), onde também é possível verificar que os níveis de expressão gênica para este gene já é alta logo no início da cinética de infecção, mas que atinge em 5 dias de interação com a planta mais que o dobro da expressão observada no início da infecção.

Vale salientar que pode ter havido saturação do sinal no filme e aí a relação entre a área revelada pela densitometria e o sinal no filme não é mais linear. Isso vale para todas as análises feitas aqui. Mas, de uma maneira geral há uma concordância entre os resultados de RT-PCR e aqueles do macroarranjo.

Figura 30. RT-PCR semi-quantitativa da ORF XAC2370 (A). Gel de agarose 1,2 % contendo 25 uL do produto da RT-PCR. Colunas 1 a 6 correspondem a *Xac* nas diferentes condições, sendo 1) cultivada em meio CN; 2) cultivada por 12 horas em meio XAM1; 3) cultivada por 20 horas em meio XAM1; 4) exsudado de folhas após 3 dias da inoculação; 5) exsudado de folhas após 5 dias da inoculação e 6) controle negativo da reação. (B) Sonda da ORF XAC2370 purificada. A sonda (coluna 1) foi marcada e utilizada na hibridação da membrana. (C) “Southern blot” revelado em filme de Raio X. Colunas 1 a 6 correspondem às mesmas condições descritas em A. M corresponde ao marcador de peso molecular (Ladder de 1 Kb da Invitrogen).

Figura 31. Área do traçado densitométrica da autorradiografia gerada pela hibridação da membrana de cDNA de *Xac* cultivadas em diferentes condições. A membrana foi hibridada com a sonda da ORF XAC2370 (Figura 30C).

As **Figuras 30 e 31** mostram os resultados da RT-PCR semi-quantitativa para o gene XAC2370, codificador de uma proteína possivelmente secretada. Essas Figuras mostram que, quando a *Xac* se encontrava no meio de cultivo CN, este gene não mostrou expressão alguma, enquanto que na condição de cultivo por 12 e 20 horas no meio XAM1 é possível visualizar a presença de bandas fracas (Figura 30). A visualização de banda fica mais evidente em 3 dias de interação *Xac*::planta hospedeira, sendo que a mesma mostra-se aumentada em 5 dias após a inoculação. Ao analisarmos os resultados do macroarranjo para o gene XAC2370 (**Tabela 19**) verificamos que este gene realmente teve uma expressão inferior à expressão verificada para os outros dois genes estudados (XAC0398 e XAC0416) e, além disso, os resultados obtidos por RT-PCR semi-quantitativa concordam com os observados no macroarranjo.

Figura 32. RT-PCR semi-quantitativa da ORF XAC4291 (rDNA 16S) (A). Gel de agarose 1,2 % contendo 25 uL do produto da RT-PCR (A). Colunas 1 a 6 correspondem a *Xac* nas diferentes condições, sendo 1) cultivada em meio CN; 2) cultiva por 12 horas em meio XAM1; 3) cultivada por 20 horas em meio XAM1; 4) exsudada de folhas após 3 dias da inoculação; 5) exsudada de folhas após 5 dias da inoculação e 6) controle negativo da reação. (B) Sonda da ORF XAC4291 (rDNA 16S) purificada. A sonda (coluna 1) foi marcada e utilizada na hibridação da membrana. (C) “Southern blot” revelado em filme de Raio X. Colunas 1 a 6 correspondem às mesmas condições descritas em A. M corresponde ao marcador de peso molecular (Ladder de 1 Kb da Invitrogen).

Figura 33. Densidade da autorradiografia gerada pela hibridação da membrana de cDNA de *Xac* em diferentes condições contra a sonda da ORF XAC4291 (rDNA 16S).

As **Figuras 32 e 33** apresentam os resultados obtidos para a ORF XAC4291, referente ao rDNA 16S, que foi utilizado aqui como controle de expressão constitutiva das reações de RT-PCR semi-quantitativa. Através dessas Figuras é possível visualizar que este gene, considerado de expressão constitutiva e que cujo nível de expressão varia muito pouco em diferentes condições celulares, mostrou ter sua expressão em níveis bastante próximos nas diferentes condições em que a *Xac* foi submetida. Um único desvio foi observado na condição de 12 horas de cultivo em meio XAM1, em que a expressão foi 30% maior que a média das outras condições. Este resultado provavelmente seja uma consequência de erro experimental (estimativa da quantidade de ácidos nucleicos, pipetagem, hibridação local, etc).

A utilização de pequena quantidade de RNA inicial (25 ng) e de poucos ciclos de anelamento para a reação de RT-PCR (20 ciclos), resultou em amplificações não visíveis quando observado os produtos das reações de RT-PCR semi-quantitativa diretamente no gel de agarose corado com brometo de etídeo. Por conseguinte, foi realizada a transferência para membrana de náilon seguida de “Southern blot”. Estas condições utilizadas para as reações foram devido ao interesse de verificar as amplificações justamente na fase geométrica da reação de PCR, fase esta em que se pode investigar a real diferença de amplificação em função da quantidade de seqüências molde.

Através da visualização dos resultados obtidos em filmes de raio-X, gerados a partir das RT-PCR semi-quantitativas, foi possível validar os resultados obtidos com as análises do macroarranjo para esses três genes diferencialmente expressos, o que nos leva a supor que as análises foram adequadas e realmente demonstram o comportamento dos genes estudados durante a cinética de infecção aplicada para estes, e para os outros

genes verificados como diferencialmente expressos a partir das análises de macroarranjo.

Uma vez demonstrado que a expressão de alguns genes são induzidos ou reprimidos em *Xac* quando ela interage com o hospedeiro compatível, levando à manifestação do cancro, ficava ainda a pergunta se essa regulação é mesmo devida à presença nestes genes de seqüências responsáveis à planta (“PIP box”). Para testar então se a repressão ou indução destes genes era regulada por seqüências do tipo “PIP box”, a região promotora de dois genes que se mostraram induzidos na presença da planta foi utilizada para análise de funcionalidade tendo o gene *gus* como repórter.

5.7 Funcionalidade de “PIP box” Através de Gene Repórter

5.7.1 Obtenção do Vetor pBGUS e dos Vetores pHMGUS0416, pHMGUS0424 e pHMGUS

O gene *gus*, de 1,8 kb, foi recuperado do vetor pBin através da digestão com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Sst*I (= *Sac*I) como mostra a **Figura 34**. A Figura em questão mostra claramente a digestão total do vetor, resultando na liberação do fragmento de 1,8 Kb correspondente ao gene *gus*.

Figura 34. Remoção do gene *gus* presente no vetor pBin. Gel de agarose 1%. Coluna M corresponde ao marcador de peso molecular (DNA Ladder/Biolabs) em kilobases (Kb). Coluna 1 corresponde a 25 μ L da digestão do vetor pBin utilizando as endonucleases *Bam*HI e *Sac*I. Seta indica o fragmento correspondente ao gene *gus*.

O fragmento de 1,8 Kb da **Figura 34** foi eluído do gel e purificado através do kit S.N.A.P.TM (Invitrogen), sendo em seguida clonado no vetor pBSKII (aproximadamente 3,0 Kb), digerido com as mesmas enzimas, dando origem à construção pBGUS (aproximadamente 4,8 Kb). O vetor pBGUS foi então eletroporado em células competentes de *E.coli* DH10B, como descrito em Material e Métodos, e a presença do vetor em clones de *E.coli* transformada foi verificado através do

isolamento de DNA plasmidial e digestão dos mesmos com as endonucleases *Bam*HI e *Sac*I (**Figura 35**).

Figura 35. Presença do vetor pGUS em clone de *E. coli* DH10B transformada. Gel de agarose 1%. Coluna 1 e 2 correspondem respectivamente ao vetor pBGUS digerido com as endonucleases *Bam*HI e *Sac*I e ao vetor pBGUS linearizado com a endonuclease *Eco*RI. Coluna M corresponde ao marcador de peso molecular (DNA Ladder/Biolabs) em kilobases (Kb).

A **Figura 35** mostra claramente que o vetor pBGUS digerido com as endonucleases liberou o fragmento correspondente ao gene *gus* clonado. Uma vez confirmada a construção por digestão com endonucleases, restava ainda confirmar a integridade do gene *gus*, a qual foi confirmada por seqüenciamento automático no seqüenciador ABI3700 (Applied Biosystems) utilizando a química do “BigDye Terminator” (Applied Biosystems) e os primers de seqüenciamento dos promotores T7 e T3 que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pBSKII. A seqüência de bases resultante do seqüenciamento foi submetida à análise, utilizando o algoritmo Blastx, contra o centro de dados público NCBI (National Center for Biotechnology Information). O resultado obtido confirmou que o inserto presente no vetor pBGUS correspondia realmente à seqüência do gene *gus*, codificador da enzima β -glucuronidase. O seqüenciamento confirmou ainda que a metionina inicial da seqüência

do gene *gus* encontrava-se adjacente ao sítio da enzima *Bam*HI. Desta forma, o vetor pBGUS construído apresenta a representação esquemática ilustrada na **Figura 36**.

Figura 36. Esquema geral do vetor pBGUS. A Figura indica os sítios de restrição utilizados para clonar o gene *gus* no vetor pBSKII.

Este vetor pBGUS foi utilizado para clonagem da região promotora de dois genes de *Xac* que se mostraram induzidos pela planta hospedeira, sendo que as seqüências promotoras (“PIP box” putativas) foram inseridas a 5’ (“upstream”) da metionina do gene *gus*. Os dois genes de *Xac* escolhidos para teste do promotor foram: 1) XAC0416, que codifica a proteína de virulência Hpa1 (discutida na classe funcional relacionada ao SSTT, ítem 4.5.3.1) e que foi utilizado na validação do macroarranjo através da técnica de RT-PCR semi-quantitativa (ítem 4.6, Figuras 28 e 29); 2) o XAC0424, que codifica uma diguanilato ciclase, enzima envolvida na síntese do segundo mensageiro diguanilato cíclico (c-diGMP) e que em *Vibrio cholerae* verificou-se estar relacionado à formação de biofilme e adesão ao hospedeiro (D'Argenio & Samuel, 2004) (discutida na classe funcional relacionada ao flagelo, biofilme e adesividade, ítem 4.5.3.6). Para tanto, os oligonucleotídeos desenhados para amplificar as seqüências promotoras dos genes XAC0416 e XAC0424 (descrito em 3.16.1.2) foram utilizados em reações de PCR e, para minimizar os erros durante os ciclos de

amplificação, foi utilizada a enzima Taq HiFi (“Taq DNA Polymerase High Fidelity”, Invitrogen). O produto das amplificações por PCR das seqüências promotoras dos genes XAC0416 e XAC0424 foi então analisado em gel de agarose e o resultado obtido foi uma única banda em cada caso e com o tamanho esperado de 0,5 Kb (**Figura 37**).

Figura 37. Amplificação por PCR da região promotora dos genes XAC0416 e XAC0424. Gel de agarose 1,0%. Colunas 1 e 2 correspondem às amplificações das seqüências promotoras dos genes XAC0416 e XAC0424, respectivamente. Coluna M corresponde ao marcador de peso molecular de 1 Kb (1 Kb DNA Ladder, Gibco).

Estas seqüências promotoras, que possuem em cada extremidade sítios para as enzimas *EcoRI* e *BamHI* (como já descrito no item 3.16.1.2 da metodologia), foram então purificadas do gel com o kit S.N.A.P. (Invitrogen) e clonadas no vetor pBGUS digerido com as mesmas enzimas e usando a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs). Os resultados destas ligações geraram os vetores denominados pBGUS0416 e pBGUS0424, com tamanho aproximado de 5,3 Kb cada (3,0 Kb do vetor pBSKII + 1,8 Kb do GUS + 0,5 Kb da seqüência promotora). Uma ilustração exemplificando uma dessas construções pode ser observada na **Figura 38**.

Figura 38. Ilustração da construção pBGUS0416. O esquema mostra as inserções das seqüências do gene *gus* e da região promotora do gene XAC0416 e seus respectivos sítios de clonagens, bem como a posição dos promotores T3 e T7.

Os plasmídeos contendo as construções desejadas (pBGUS0416 e pBGUS0424) foram eletroporados em células competentes de *E. coli* DH10B e clones contendo os respectivos plasmídeos foram selecionados através da marca de resistência ao antibiótico ampicilina. O DNA plasmidial de colônias de *E. coli* resistentes à ampicilina, para as duas construções, foi então isolado e digerido com as endonucleases *Hind*III e *Sac*I, o que possibilita a liberação dos fragmentos de interesse (ver **Figuras 36 e 38**). Após a digestão com *Hind*III e *Sac*I os fragmentos liberados foram analisados em gel de agarose 1%, obtendo-se os seguintes resultados:

- No vetor pBGUS0416 houve a liberação da seqüência promotora do gene XAC0416 + o gene *gus* (fragmento de 2,3 Kb, dado não mostrado);
- No vetor pBGUS0424 houve a liberação da seqüência promotora do gene XAC0424 + o gene *gus* (fragmento de 2,3 Kb, dado não mostrado);
- No vetor pBGUS houve a liberação da seqüência do gene *gus* (fragmento de 1,8 Kb, dado não mostrado).

Os fragmentos de interesse foram então purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit S.N.A.P. (Invitrogen) e clonados no vetor pHM1, um vetor que possui

origem de replicação em *E. coli* e em *Xanthomonas*, e que havia sido digerido com as endonucleases *Hind*III e *Sac*I, e em seguida procedeu-se a ligação do fragmento purificado com o pHM1. O produto das reações de ligação foi utilizado para eletroporar células competentes de *E. coli* DH10B e colônias resistentes à espectinomicina (marca de seleção do vetor pHM1) foram selecionadas. O DNA plasmidial dessas colônias foi isolado e digerido com as enzimas *Hind*III e *Sac*I para verificar se ocorria a liberação de um fragmento de tamanho esperado para cada caso, o que confirmaria a clonagem. A análise em gel de agarose confirmou a obtenção de clones de *E. coli* contendo as construções pHMGUS0416, pHMGUS0424 e pHMGUS. Na **Figura 39** estão mostrados os resultados referentes às construções pHMGUS0416 e pHMGUS0424, sendo que para as três construções o fragmento liberado apresentou o tamanho esperado.

Figura 39. Clones de *E. coli* contendo as construções pHMGUS0416 e pHMGUS0424. Gel de agarose 1%. O DNA plasmidial foi digerido com as enzimas *Hind*III e *Sac*I. Gel de agarose 1%. Colunas 1 e 2 mostram a liberação das seqüências promotoras dos genes XAC0416 e XAC0424 + seqüência do gene *gus*. Coluna M corresponde ao marcador de peso molecular de 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen) apresentado em Kb. A seta indica o fragmento de aproximadamente 2,3 Kb, que corresponde ao gene *gus* ligado à região promotora dos genes XAC0416 e XAC0424.

Os plasmídeos contendo as construções desejadas (**Figura 40**) foram então utilizados para eletroporar células competentes da *Xac* e colônias de *Xac* contendo as construções foram isoladas a partir de plaqueamento em meio de cultura AN contendo o antibiótico espectinomicina. Colônias de *Xac* contendo as construções pHMGUS0416, pHMGUS0424 e pHMGUS foram então utilizadas para análise da expressão do gene *gus* em condições infectantes e não infectantes através da medida da atividade da proteína GUS (β -glucuronidase) sobre o seu substrato cromogênico sintético (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronídeo; X-gluc).

Figura 40. Construções finais para o ensaio de gene repórter. (A) Construção no vetor pHM1 contendo o gene *gus* e a sequência promotora (“PIP box”) do gene XAC0416 ou XAC0424; (B) Construção no vetor pHM1 contendo apenas a sequência do gene *gus*, utilizada como controle.

5.7.2 Análise da Atividade Enzimática de GUS

Como descrito em Material e Métodos, a atividade da proteína GUS sobre seu substrato cromogênico sintético foi realizado em triplicata utilizando bactérias presentes em 100 μL de suspensão bacteriana ($\text{DO}_{600} = 0,3$) de *Xac* selvagem ou transformada (pHMGUS0416, pHMGUS0424 e pHMGUS), cultivada nos meios CN, XAM1 ou exsudada da folha de laranjeira após 3 e 5 dias da inoculação. A suposição aqui utilizada é a de que usando volumes iguais de soluções bacterianas na mesma DO teríamos aproximadamente o mesmo número de bactéria em todos os casos. Uma outra possibilidade seria quantificar a proteína total presente em cada reação.

A atividade de GUS sobre o substrato cromogênico foi observada de duas maneiras: visualização da cor azul desenvolvida (qualitativo), com registro fotográfico, e leitura espectrofotométrica a 600 nm (quantitativo). Os resultados referentes ao desenvolvimento de cor estão apresentados nas **Figuras 41, 42 e 43** e os referentes à determinação espectrofotométrica estão apresentados na **Tabela 19** e na **Figura 44**.

Figura 41. Análise enzimática da atividade de GUS em *Xac* selvagem e em *Xacs* contendo as construções pHMGUS, pHMGUS0424 e pHMGUS0416 após 20 horas de cultivo em meio de cultura. A incubação na presença do substrato (X-gluc) de GUS foi de 2 horas. **A)** *Xac* selvagem (isolado 306); **B)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS (controle negativo); **C)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS0424 e **D)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS0416. As posições **1** e **2** correspondem à *Xac* cultivada em meio CN e **3** e **4** correspondem à *Xac* cultivada em meio XAM1. **T** corresponde à *Xac* em tampão do X-gluc e **T + S** corresponde à *Xac* em tampão + X-gluc.

Figura 42. Análise enzimática da atividade de GUS em *Xac* selvagem e em *Xacs* contendo as construções pHMGUS, pHMGUS0424 e pHMGUS0416 após 3 dias de inoculação em folha de laranjeira. A incubação na presença do substrato (X-gluc) de GUS foi de 2 horas. **A)** *Xac* selvagem (isolado 306); **B)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS (controle negativo); **C)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS0424 e **D)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS0416. A posição **1** corresponde à *Xac* em tampão do X-gluc e **2** corresponde à *Xac* em tampão + X-gluc. **T** corresponde à *Xac* em tampão do X-gluc e **T + S** corresponde à *Xac* em tampão + X-gluc.

Figura 43. Análise enzimática da atividade de GUS em *Xac* selvagem e em *Xacs* contendo as construções pHMGUS, pHMGUS0424 e pHMGUS0416 recuperadas após 5 dias de inoculação em folha de laranjeira. A incubação na presença do substrato (X-gluc) de GUS foi de 2 horas. **A)** *Xac* selvagem (isolado 306); **B)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS (controle negativo); **C)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS0424 e **D)** *Xac* transformada com a construção pHMGUS0416. A posição **1** corresponde à *Xac* em tampão do X-gluc e **2** corresponde à *Xac* em tampão + X-gluc. **T** corresponde à *Xac* em tampão do X-gluc e **T + S** corresponde à *Xac* em tampão + X-gluc.

Os resultados qualitativos das **Figuras 41A, 42A e 43A** mostram claramente que a *Xac* selvagem, isolado 306, não apresenta atividade de GUS, independente do meio em que se encontra, mesmo que a reação se proceda por até 24 horas (resultado não apresentado). Este resultado vai de encontro ao fato de que no genoma da *Xac* não foi encontrada nenhuma proteína com similaridade à β -glucuronidase (Da Silva *et al.*, 2002) e também revela um outro fato importante, qual seja, de que o substrato X-gluc não sofre autohidrólise nas condições e tempos de reação utilizados. Isso permite então concluir que o aparecimento de coloração azul na reação deve-se à expressão da enzima β -glucuronidase presente nas construções e da sua atividade sobre o substrato X-gluc e não à autohidrólise do substrato.

Ao longo da cinética de infecção podemos verificar que os tubos contendo as reações enzimáticas das *Xacs* transformadas com as construções pHMGUS0424 e pHMGUS0416 apresentaram coloração azul (**Figuras 41, 42 e 43**). A *Xac* transformada com a construção pHMGUS0416 apresentou coloração azul já com 20 horas de cultivo no meio CN ou no meio indutor XAM1 (Figura 41D). Este resultado indica que o promotor do gene XAC0416 foi ativado neste período e induziu a expressão do gene *gus*, sendo que esta ativação da transcrição foi maior quando a *Xac* se encontrava no meio indutor XAM1 do que no meio rico CN (Figura 41D). Os resultados mostram ainda que maior atividade de GUS foi observada quando a *Xac* com a construção pHMGUS0416 se encontrava em folha de laranjeira (3 e 5 dias após a inoculação; Figuras 42D e 43D). Estes resultados estão em concordância com os resultados obtidos no macroarranjo e na RT-PCR semi-quantitativa.

A *Xac* contendo a construção pHMGUS0424 também apresentou atividade de GUS, entretanto esta atividade só se tornou bem visível aos 5 dias após a interação com a folha de laranjeira (Figuras 41C, 42C e 43C), ainda que uma atividade bem pequena pudesse ser vista após os 3 dias “in planta” mas que não é perceptível na foto (Figura 42C). No macroarranjo foi observada indução da expressão do gene XAC0424 já a partir de 20 horas de cultivo em meio indutivo, continuando até 5 dias após a inoculação “in planta”. Os resultados do macroarranjo indicam que o gene XAC0424 é bem menos induzido que o gene XAC0416 (3,5 a 8,0 vezes) e, interessante, o promotor do XAC0416 gerou maior atividade de GUS em relação ao promotor do XAC0424, o que pode ser visto claramente na Figura 43C e 43D.

Um resultado inesperado foi apresentado pela *Xac* contendo a construção pHMGUS. A construção pHMGUS foi feita com a finalidade de ser um controle negativo, ou seja, uma construção que não tivesse região promotora e que,

conseqüentemente, não ativaria a transcrição do gene *gus*, e por conseguinte não haveria atividade enzimática de GUS sob o substrato X-gluc. Para que ocorresse a produção da proteína GUS, e o conseqüente aparecimento da cor azul, seria necessário ter um promotor “upstream” da seqüência do gene *gus*, promotor este que seria representado pela seqüência “PIP box”. Entretanto, observamos que *Xac* contendo a construção pHMGUS apresentou coloração azul em todos os tempos da cinética de infecção estudada (Figuras 41B, 42B e 43B). Na Figura 41B é possível observar que a coloração azul, que revela a atividade de GUS, é mais intensa quando a *Xac* foi cultivada em meio CN do que quando cultivada no meio indutor XAM1. Além disso, é possível observar que a *Xac* contendo a construção pHMGUS apresentou uma maior atividade de GUS após três e cinco dias de contato com a planta hospedeira (Figuras 42B e 43B). Visualizamos duas hipóteses para explicar estes resultados: o vetor pHM1 utilizado para a construção do pHMGUS possui uma seqüência que codifica alguma enzima com atividade de β -glucuronidase e, portanto, capaz de degradar o substrato X-gluc, ou o próprio promotor lac (da enzima β -galactosidase) que se encontra a 5' do sítio múltiplo de clonagem do vetor pHM1 está sendo capaz de ativar a transcrição do gene *gus*. Para testar a primeira hipótese, *Xac* transformada apenas com o plasmídeo pHM1 foi obtida e submetida aos mesmos experimentos de atividade enzimática de GUS realizados para as outras *Xacs* transformadas. Os resultados mostraram que o pHM1 não contém nenhuma outra enzima capaz de degradar o substrato X-gluc, tendo em vista que a reação enzimática não resultou em nenhuma coloração azul mesmo após 24 horas de incubação (dados não mostrados). Diante disso restou-nos a hipótese de que o promotor lac da β -galactosidase provavelmente esteja sendo capaz de ativar a transcrição do gene *gus* na construção pHMGUS. Entretanto, *Xac* transformada com a construção pHMGUS0424 não apresenta cor azul após 20 horas em meio CN ou meio indutor XAM1, enquanto

Xac transformada com pHMGUS apresenta coloração azul no dois meios nesse período de incubação. *Xac* transformada com a construção pHMGUS0424 só apresenta coloração azul visível após 5 dias de inoculação “in planta”, ainda assim bem menos intensa do que a coloração apresentada por *Xac* transformada com pHMGUS nessas mesmas condições. Este resultado sugere que a introdução do fragmento de 500 pb do promotor “PIP box” entre o promotor lac e o gene *gus* interrompe a capacidade do promotor lac de transcrever uma sequência GUS funcional. Assim, embora não tenhamos conseguido um controle negativo funcional, os resultados em conjunto nos permitem sugerir que o aparecimento de cor azul observado para as construções pHMGUS0424 e pHMGUS0416 é resultado da atividade dos promotores “PIP box” dos genes XAC0424 e XAC0416 e não de um outro promotor.

A intensidade da cor azul presente nos tubos foi também determinada espectrofotometricamente e os valores obtidos para cada uma das três repetições em cada experimento estão apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20. Absorbância das reações enzimáticas contendo na *Xac* selvagem (306) ou *Xacs* com as construções pHMGUS0416, pHMGUS0424 e pHMGUS e estimativa da atividade de GUS.

Condição Experimental	Leitura a 600 nm (DO ₆₀₀)			Média	Desvio Padrão	Leitura após (min.)	Atividade de GUS (DO ₆₀₀)/minuto
	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3				
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS0416 (CN20 hs)	0,329	0,419	0,368	0,372	0,045	60	0,0062
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS0416 (XAM1 20 hs)	0,357	0,447	0,396	0,400	0,045	60	0,0066
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS0416 (3 D.A.I.)	0,578	0,608	0,602	0,596	0,016	30	0,0199
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS0416 (5 D.A.I.)	0,916	0,820	1,030	0,922	0,105	30	0,0307
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS0424 (CN 20 hs)	0,032	0,028	0,030	0,030	0,002	60	0,0005
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS0424 (XAM1 20 hs)	0,022	0,061	0,091	0,058	0,035	60	0,0010
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS0424 (3 D.A.I.)	0,151	0,145	0,181	0,159	0,019	60	0,0026
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS0424 (5 D.A.I.)	0,195	0,165	0,183	0,181	0,015	60	0,0030
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS (CN 20 hs)	0,095	0,125	0,101	0,107	0,016	60	0,0018
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS (XAM1 20 hs)	0,023	0,015	0,028	0,022	0,007	60	0,0004
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS (3 D.A.I.)	0,542	0,500	0,527	0,523	0,021	30	0,0174
(T+S)+ <i>Xac</i> ::pHMGUS (5 D.A.I.)	0,526	0,556	0,556	0,546	0,017	30	0,0182
(T+S)+ <i>Xac</i> 306 selvagem (CN 20 hs)	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	120	0,0000
(T+S)+ <i>Xac</i> 306 selvagem (XAM1 20 hs)	0,001	0,000	0,000	0,000	0,001	120	0,0000
(T+S)+ <i>Xac</i> 306 selvagem (3 D.A.I.)	0,002	0,000	0,002	0,001	0,001	120	0,0000
(T+S)+ <i>Xac</i> 306 selvagem (5 D.A.I.)	0,003	0,012	0,000	0,005	0,006	120	0,0000
(T) = branco	0,000	0,000	0,000	0,000	-	30-120	0,0000
(T) + (S)	0,000	0,000	0,000	0,000	-	30-120	0,0000

Os valores encontrados nas colunas de Repetição 1, 2 e 3 referem-se às leituras das *Xacs* em contato com o tampão contendo X-gluc contra o branco, sendo que esses valores já foram subtraídos do valores obtidos para as respectivas *Xacs* em contato com o tampão do X-gluc, também lido contra o branco.

CN 20 hs. = *Xac* cultivada em meio Caldo Nutriente por 20 horas;

XAM1 20 hs. = *Xac* cultivada em meio indutor XAM1 por 20 horas;

3 D.A.I. = *Xac* exsudada da folha de laranjeira após 3 dias de inoculação;

5 D.A.I. = *Xac* exsudada da folha de laranjeira após 5 dias de inoculação.

Como pode ser observado na **Tabela 20**, para obtermos os valores arbitrários de atividade da enzima β -glucuronidase sobre o substrato X-gluc, os valores médios de absorbância foram divididos pelo tempo da reação e obteve-se um valor que representa unidades de absorbância produzida na reação por minuto. Esses valores arbitrários de atividade da enzima β -glucuronidase podem ser observados no **Figura 44**. Se a única variável em cada tubo for o tempo e a quantidade de enzima, esta relação é uma boa estimativa da atividade enzimática, ainda que relativa. O ideal seria determinar a quantidade de proteína total presente em cada tubo e aí, utilizando o coeficiente de extinção molar do produto, determinar a atividade em termos de produto formado/minuto/mg de proteína.

Figura 44. Atividade da β -glucuronidase. Atividade específica de GUS nas construções realizadas para verificar a funcionalidade do promotor dos genes XAC0416 e XAC0424. A atividade da β -glucuronidase está apresentada em unidades de absorbância por minuto.

Na **Figura 44** verifica-se que as construções pHMGUS0416 e pHMGUS0424 apresentam atividade de GUS tanto no meio CN como no meio indutor XAM1. Entretanto, para pHMGUS0416 essa atividade é aumentada de 2,8x após 3 dias na planta e de 4,4x após 5 dias na planta. Para pHMGUS0424 esse aumento é 3x tanto para 3 como para 5 dias na planta.

Os resultados da Figura 44 concordam com os resultados das Figuras 41C e D, 42C e D e 43 C e D, onde observamos a atividade da enzima GUS através da intensidade da coloração azul das reações. Além disso, os resultados apresentados na Figura 44 para as construções pHMGUS0416 e pHMGUS0424 também concordam com os resultados obtidos no macroarranjo (**Tabela 4**), onde se verifica que o gene XAC0416 foi induzido logo no início da interação com o meio indutor XAM1 e foi aumentando sua expressão até o final da interação com a planta hospedeira (5 dias), enquanto o gene XAC0424, comparativamente ao gene XAC0416, mostrou níveis menores de indução. Além disso, na Tabela 20 e Figura 44 fica evidente a diferença de atividade da enzima GUS nas *Xacs* contendo as construções pHMGUS0416 e pHMGUS0424 após cinco dias da inoculação, onde o promotor do gene XAC0416 induziu uma atividade de GUS de 10 vezes maior que o promotor da XAC0424, concordando com o macroarranjo que mostrou que o gene XAC0416 foi em torno de 8 vezes mais expresso que o gene XAC0424 após 5 dias de contato com a planta hospedeira.

Dentre os genes utilizados para a validação pelo método de RT-PCR semi-quantitativa, um deles foi o gene XAC0416 cujos resultados também concordam com os obtidos na análise enzimática de GUS utilizando a região promotora de XAC0416 para dirigir a síntese da enzima β -glucuronidase. Entretanto, como já discutido

anteriormente, fica ainda para ser resolvida a questão da construção pHMGUS que não se comportou como esperado.

Estes resultados sugerem que as seqüências “upstream” dos genes XAC0416 e XAC0424 se comportam como promotores capazes de serem induzidos por proteínas de seu hospedeiro durante a interação com a planta, ou seja, apresentam seqüências “PIP box”. Estes resultados poderão ser confirmados utilizando outras construções. Há uma grande probabilidade de que a região promotora dos outros genes que se mostraram diferencialmente expressos na planta na análise por macroarranjo possuam também seqüências “PIP box”. Entretanto, é necessária uma análise sistemática de cada um destes genes para verificar se realmente a região promotora dos mesmos é capaz de responder à interação com a planta. A estratégia do uso de gene repórter parece ser adequada.

6. CONCLUSÃO

O uso de macroarranjo de DNA para estudo de expressão gênica em larga escala é uma técnica exploratória que, neste trabalho, permitiu evidenciar genes contendo putativos “PIP box”, mapeados no genoma da *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*), que mostraram-se diferencialmente expressos (induzidos ou reprimidos) quando a *Xac* foi confrontada com a planta hospedeira ou em meio de cultura capaz de mimetizar o espaço apoplástico vegetal;

A regulação temporal coordenada da expressão de genes “PIP-box” foi evidenciada para diferentes processos celulares. Além da já bem caracterizada regulação da expressão de genes do sistema tipo III via “PIP box”, verificada em outros patosistemas, verificamos que genes do sistema de secreção tipo II contendo “PIP box” putativos também mostraram-se diferencialmente regulados, bem como genes envolvidos no metabolismo de membrana e parede celular, sistema de captação de ferro, metabolismo de açúcares e degradação da parede vegetal, transdução de sinais, metabolismo de flagelo, formação de biofilme e adesividade, metabolismo de ácidos nucleicos, transportadores de membrana, metabolismo energético e resposta a estresse ambiental;

Além dos genes com função conhecida, também genes com função desconhecida até o momento, tanto para *Xac* como para outros organismos, e com putativos “PIP box”, responderam ao contato com a planta hospedeira, o que os torna candidatos a novos genes que desempenham um papel na interação *Xac* planta hospedeira. São então excelentes candidatos para estudos investigativos a respeito de suas funções nos mecanismos de patogenicidade e virulência da *Xac*;

Os resultados de controle da expressão gênica em *Xac* mediado por promotores do tipo “PIP box” indicaram que esta regulação pode ser dar de maneira a induzir ou reprimir a expressão de genes importantes para que o patógeno se estabeleça no hospedeiro, a partir de sua interação com a planta. Sendo assim, propomos uma readequação do termo “PIP box” (**P**romotores **I**nduzíveis pela **P**lanta) para elementos PRP (**P**romotores **R**eguláveis pela **P**lanta);

Através da funcionalidade dos genes contendo promotores PRP e diferencialmente expressos, “in vitro” em meio indutor ou “in vivo” na planta hospedeira, propomos um modelo capaz de refletir os processos de adaptação e ativação do arsenal de patogenicidade e virulência no contato bactéria-planta. Este modelo é apresentado na **Figura 45**:

Figura 45. Representação esquemática dos processos bioquímicos envolvidos na interação entre *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) e seu hospedeiro. Os produtos dos genes PRP induzidos durante a adaptação e ataque do fitopatógeno a plantas hospedeiras foram agrupados em seções funcionais ilustradas por diferentes cores e segundo a sub-localização celular.

Tomados em seu conjunto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o reconhecimento e instalação no ambiente da planta hospedeira representam uma situação de estresse para o patógeno. A regulação diferencial de genes codificadores para uma proteína de choque térmico e para proteínas periplasmáticas osmoreguladoras podem refletir este processo de adaptação, assim como processos de adesividade ao hospedeiro mediados pelo segundo mensageiro c-diGMP e de captação de ferro, possibilitando a execução do programa de patogenicidade e virulência determinantes na indução dos sintomas do cancro cítrico. O bombardeio da planta hospedeira por dentro, através da secreção de proteínas de virulência pelo sistema tipo III no citoplasma da célula vegetal, e de fora para dentro através da secreção nos espaços intercelulares de enzimas degradadoras da parede celular vegetal, asseguram o sucesso do processo infeccioso ao disponibilizar nutrientes (açúcares, aminoácidos) para a colônia de bactérias invasoras, favorecendo a etapa necrótica da doença, onde a ruptura da epiderme vegetal leva à liberação de altos títulos do fitopatógeno bacteriano para dispersão rumo a novos hospedeiros.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRIA, M.C.; DOCENA, C.; KHATER, L.; RAMOS, C.H.I.; DA SILVA, A.C.R. & FARAH, C.S. New protein-protein interactions identified for the regulatory and structural components and substrates of the type III secretion system of the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, **186**, 6186-6197. 2004.
- ALFANO, J.R. & COLLMER, A. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. **Journal of Bacteriology**, **179**, 5655-5662. 1997.
- ALVAREZ, A.M.; BENEDICT, A.A.; MIZUMOTO, C.Y.; POLLARD, L.W. & CIVEROLO, E.L. Analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* and *X. c. citrumelo* with monoclonal antibodies. **Phytopathology**, **81**, 857-865, 1991.
- AMARAL, A.M.do; CARVALHO, S.^a; DOMINGUES, A.D., DEZOTTI, D.F.; BAPTISTA, J.C. & MACHADO, M.A. Reação de acessos de citros à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* sob condições de cas-de-vegetação. **Fitopatologia brasileira**, **28**, p.S284, 2003.
- ARLAT, M.; GOUGH, C.L.; BARBER, C.E.; BOUCHER, C. & DANIELS, M.J. *Xanthomonas campestris* contains a cluster of *hrp* genes related to the larger *hrp* cluster of *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4**, 593-601, 1991.
- ASTUA-MONGE, G.; FREITAS-ASTUA, J.; BACOCINA, G.; RONCOLETTA, J.; CARVALHO, S.A. & MACHADO, M.A. Expression profiling of virulence and pathogenicity genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Journal of Bacteriology**, **187**, 1201-1205, 2005.
- BARNY, M.A.; GUINEBRETIERE, M.H.; MARÇAIS, B.; COISSAC, E.; PAULIN, J.P. & LAURENT, J. Cloning of large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. **Molecular Microbiology**, **4**, 777-786, 1990.

- BENJAMINI, Y. & HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, **57**, 289-300, 1995.
- BERGAMIN-FILHO, T.; AMORIM, L.; LARANJEIRA, F. & GOTTWALD, T.R. Epidemiology of citrus canker in Brazil with and without the Asian citrus leafminer. In: INTERNATIONAL CITRUS CANCER RESEARCH WORKSHOP, Ft. Pierce, Fl. 2000. **Proceedings**. Florida, 2000. p.20-22.
- BERHOUE, G.G.A. **Cancrosis de los cítricos**. Valencia, 1993, 56p. Monografia: Master em citricultura. Universidade Politécnica de Valencia, Espanha, 1993.
- BITANCOURT, A.A. O Cancro cítrico. **Biológico**, **23**, 101-111, 1957.
- BOHIN, J.P. Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, **186**, 11-19, 2000.
- BONAS, U.; SCHULTE, R.; FENSELAU, S.; MINSAVAGE, G.V.; STASKAWICZ, B.J. & STALL, R.E. Isolation of a gene-cluster from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that determines pathogenicity and the hypersensitive response on pepper and tomato. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **4**, 81-88, 1991.
- BOUCHER, C.A.; Van GISEGEM, F.; BARBERIS, P.A.; ARLAT, M. & ZISCHEK, C. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco are clustered. **Journal of Bacteriology**, **169**, 5626-5632, 1987.
- BRADBURY, J.F. **Guide to plant Pathogenic Bacteria**. Slough: C.A.B. International, 1993. 332p.
- BRAITHWAITE, M.; LEITE JR., R.P.; SMITH, J.J.; BOA, E. & SADDLER, G.S. First report of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* on *Citrus sinensis* in Bolivia [online] New Disease Reports. August, 2001. Disponível em www.bspp.org.uk/ndr/index.htm (23/08/2005).

- BRAUN, V. & BRAUN, M. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, **529**, 78-85, 2002.
- BRITO, B.; MAREDA, M.; BARBERIS, P.; BOUCHER, C. & GENIN, S. *prhJ* and *hrpG*, two new components of the plant signal-dependent regulatory cascade controlled by PrhA in *Ralstonia solanacearum*. **Molecular Microbiology**, **31**, 237-251, 1999.
- BROWN, K. Florida fights to stop citrus canker. **Science**, **292**, 2275-2278, 2001.
- BUELL, C.R.; JOARDAR, V.; LINDEBERG, M.; SELENGUT, J.; PAULSEN, I.T.; GWINN, M.L.; DODSON, R.J.; DEBOY, R.T.; DURKIN, A.S.; KOLONAY, J.F.; MADUPU, R.; DAUGHERTY, S.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.J.; HAFT D.H.; NELSON, W.C.; DAVIDSEN, T.; ZAFAR, N.; ZHOU, L.; LIU, J.; YUAN, Q.; KHOURI, H.; FEDOROVA, N.; TRAN, B.; RUSSELL, D.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; VAN AKEN, S.E.; FELDBLYUM, T.V.; D'ASCENZO, M.; DENG, W.L.; RAMOS, A.R.; ALFANO, J.R.; CARTINHO, S.; CHATTERJEE, A.K.; DELANEY, T.P.; LAZAROWITZ, S.G.; MARTIN, G.B.; SCHNEIDER, D.J.; TANG, X.; BENDER, C.L.; WHITE, O.; FRASER, C.M. & COLLMER, A. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **100**, 10181-10186, 2003.
- BÜTTNER, D. & BONAS, U. Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the cell. **The EMBO Journal**, **21**, 5313-5322, 2002
- CARTER, D.M.; GAGNON, J.N. DAMLAJ, M.; MANDAVA, S. MAKOWSKI, L.; RODI, D.J.; PAWELEK, P.D. & COULTON, J.W. Phage Display Reveals Multiple Contact Sites between FhuA, an Outer Membrane Receptor of *Escherichia coli*, and TonB. **Journal of Molecular Biology**, **357**, 236-251, 2006.
- CHARKOWSKI, A.O.; ALFANO, J.R.; PRESTON, G.; YUAN, J.; HE, S.Y. & ALAN COLLMER, A. The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains

similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. **Journal of Bacteriology**, **180**, 5211-5217, 1998.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, **162**:156, 1987.

CIESIOLKA, L.D.; HWIN, T.; GEARLDS, J.D.; MINSAVAGE, G.V.; SAENZ, R.; BRAVO, M.; HANDEY, V.; CONOVER, S.M.; ZHANG, H.; CAPORGNO, J.; PHENGRASAMY, N.B.; TOMS, A.O.; STALL, R.E.; WHALEN, M.C. Regulation of expression of avirulence gene *avrRxv* and identification of a family of host interaction factors by sequence analysis of *avrBsT*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **12**, 35-44, 1999.

CIVEROLO, E.L. Bacterial canker disease of citrus. **Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society**, **37**, 127-146, 1984.

CORNELIS, G.R.; Van GIJSEGEM, F. Assembly and function of type III secretory systems. **Annual Review Microbiology**, **54**, 735-774, 2000.

COLLMER, A.; LINDEBERG, M.; PETNICKI-OCWIEJA, T.; SCHNEIDER, D.J. & ALFANO, J.R. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. **TRENDS in Microbiology**, **10**, 462-469, 2002.

COWLES, C.E.; NICHOLS, N.N. & HARWOOD, C.S. BenR, a XylS Homologue, Regulates Three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, **182**, 6339-6346, 2000.

COX, J.M. Applications of nylon membrane arrays to gene expression analysis. **Journal Immunological Methods**, **250**, 3-13, 2001.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L.

(Eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Maryland USA: American Society of Plants Physiologists, 2001, 850-829.

CUBERO, J. & GRAHAM, J.H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Applied Environment Microbiology**, **68**, 1257-1264, 2002.

CUNNAC, S.; OCCHIALINI, A.; BARBERIS, P.; BOUCHER, C.; GENIN, S. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. **Molecular Microbiology**, **53**, 115-128, 2004a.

CUNNAC, S. BOUCHER, C.; & GENIN, S. Characterization of the *cis*-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. **Journal of Bacteriology**, **186**, 2309-2318, 2004b.

D'ARGENIO, D.A. & MILLER, S.I. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. **Microbiology**, **150**, 2497-2502, 2004.

Da SILVA, A.C.R.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARRA, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; Van SLUYS, M.A.; ALMEIDA, N.F.; ALVES, L.M.C.; Do AMARAL, A.M.; BERTOLINI, M.C.; CAMARGO, L.E.A.; CAMAROTE, G.; CANNAVAN, F.; CARDOZO, J.; CHAMBERGO, F.; CIAPINA, L.P.; CICARELLI, R.M.B.; COUTINHO, L.L.; CURSINO-SANTOS, J.R.; EL-DORRY, H.; FARIA, J.B.; FERREIRA, A.J.S.; FERREIRA, R.C.C.; FERRO, M.I.T.; FORMIGHIERI, E.F.; FRANCO, M.C.; GREGGIO, C.C.; GRUBER, A.; KATSUYAMA, A.M.; KISHI, L.T.; LEITE, R.P.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F.; LOCALI, E.C.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.B.N.; MARTINEZ-ROSSI, N.M.; MARTINS, E.C.; MEIDANIS, J.; MENCK, C.M.; MIYAKI, C.Y.; MOON, D.H.; MOREIRA, L.M.; NOVO, M.T.M.; OCURRA, V.K.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; PEREIRA, H.A.; ROSSI, A.; SENA, J.A.D.; SILVA, C.; De SOUZA, R.F.; SPINOLA, L.A.F.; TAKITA,

- M.A.; TAMURA, R.E.; TEIXEIRA, E.C.; TEZZA, R.I.D.; TRINDADE dos SANTOS, M.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; WHITE, F.F.; SETÚBAL, J.C. & Kitajima, J.P. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature**, **417**, 459-463, 2002.
- EGEL, D.S.; GRAHAM, J.H. & STALL, R.E. Genomic relatedness of *Xanthomonas campestris* strains causing disease of citrus. **Applied Environment Microbiology**, **57**, 2724-2730, 1991.
- ETCHEGARAY, A.; SILVA-STENICO, M.E.; MOON, D.H. & TSAI, S.M. In silico analysis of nonribosomal peptide synthetases of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: identification of putative siderophore and lipopeptide biosynthetic genes. **Microbiological Research**, **159**, 425-437, 2004.
- FENSELAU, S. & BONAS, U. Sequence and expression analysis of the *hrpB* pathogenicity operon of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* which encodes eight proteins with similarity to components of the Hrp, Ysc, Spa and Fli secretion systems. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **8**, 845-854, 1995.
- FLOR, H.H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review Phytopathology**, **9**, 1971.
- FREDERICK, R.D., MAJERCZAK, D.R. & COPLIN, D.L. Characterization of *wts* genes from *Erwinia stewartii* and their homology with the *hrp* gene cluster from *Pseudomonas syringae phaseolica*. **Phytopathology**, **81**, 1187 (Abstr.), 1991.
- FURUTANI, A.; TSUJE, S.; OHNISHI, K.; HIKICHI, Y.; OKU, T.; TSUNO, K.; INOUE, Y.; OCHIAI, H.; KAKU, H. & KUBO, Y. Evidence for HrpXo-dependent expression of type II secretory proteins in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, **186**, 1374-1380, 2004.
- FURUTANI, A.; NAKAYAMA, T.; OCHIAI, H.; KAKU, H.; KUBO, Y. & TSUGE, S. Identification of novel HrpXo regulons preceded by two cis-acting elements, a plant-inducible promoter box and a -10 box-like sequence, from the genome

- database of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **FEMS Microbiology Letters**, **259**, 133-141, 2006.
- GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. An overview of the road map to the manual. **Systematic Bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, 2000. 20p. (Bergey's Manual).
- GENIN, S.; GOUGH, CL.; ZISCHEK, C. & BOYCHER, C.A. Evidence that the *hrpB* gene encodes a positive regulator of pathogenicity genes from *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Microbiology**, **6**, 3065-3076, 1992.
- GENTLEMAN, R.C.; CAREY, V.J.; BATES, D.M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A.J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J.Y.H. & ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, **5**, R80, 2004.
- GILLET, R. & FELDEN, B. Emerging views on tmRNA-mediated protein tagging and ribosome rescue. **Molecular Microbiology**, **42**, 879–885, 2001.
- GOODMAN, R.N. & NOVACKY, A.J. **The hypersensitive reaction in plants to pathogens: A resistance phenomenon**. St. Paul: APS Press, 1994.
- GOPHNA, U.; RON, E.Z. & GRAUR, D. Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. **Gene**, **312**, 151-163, 2003.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. & SCHUBERT, T.S. **Citrus canker: The pathogen and its impact**. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2002-0812-01-RV.
- GRAVENA, S. **O cancro e a minadora**. Informativo Coopercitrus, v.12, n.141, p.18, 1998.

- GUTTMAN, D.S.; VINATZER, B.A.; SARKAR, S.F.; RANALL, M.V.; KETTLER, G. & GREENBERG, J.T. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. **Science**, **295**, 1722-1726, 2002.
- HANTKE, K. Iron and metal regulation in bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, **4**, 172-177, 2001.
- HARTUNG, J.S. & CIVEROLO, E.L. Restriction fragment length polymorphisms distinguish *Xanthomonas campestris* strains isolated from Florida citrus nurseries from *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Pages 503-508 in: **Proceedings of the 7th International Conference Plant Pathogenic Bacteria**, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary, 1989.
- HARTUNG, J.S. Plasmid-based hybridization probes for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. **Plant Disease**, **76**, 889-893, 1992.
- HARTUNG, J.S.; DANIEL, J.F. & PRUVOST, O.P. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* by the polymerase chain reaction. **Applied Environmental Microbiology**, **59**, 1143-1148, 1993.
- HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.P.; VILLEMOT, I. & ALVAREZ, A. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and nested-polymerase chain reaction. **Phytopathology**, **86**, 95-101, 1996.
- HONG, S.J.; TRAN, Q.A. & KEILER, C.K. Cell cycle-regulated degradation of tmRNA is controlled by RNase R and SmpB. **Molecular Microbiology**, **57**, 565–575, 2005.
- HU, R.M.; YANG, T.C.; YANG, S.H.; TSENG, Y.H. Deduction of upstream sequences of *Xanthomonas campestris* flagellar genes responding to transcription activation by FleQ. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **335**, 1035-1043. 2005.

- HUANG, H.C.; LIN, R.H.; CHANG, C.J.; COLLMER, A. & DENG, W.L. The complete *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of genes required for harpin_{Pss} secretion that are arranged collinearly with *Yersinia ysc* homologs. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **8**, 733-746, 1995.
- HUBER, W.; von HEYDEBRECK, A.; SULTMANN, H.; POUSTKA, A.; VINGRON, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. **Bioinformatics**, **18**, S96-S104, 2002.
- HUECK, C.J. Type III protein secretion system in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62**, 379-433, 1998.
- HUGUET, E.; HANH, K.; WENGELNIK, K. & BONAS, U. *hpaA* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are affected in pathogenicity but retain the ability to induce host-specific hypersensitive reaction. **Molecular Microbiology**, **29**, 1379-1390, 1998.
- HUTCHESON, S.W. The *hrp*-encoded protein export systems of *Pseudomonas syringae* and other plant pathogenic bacteria and their role in pathogenicity. In: **Plant-Microbe Interactions**, ed. G. Stacey; N.T. Keen, 3: 145-179. New York: Chapman Hall, 1997.
- IHAKA, R. & GENTLEMAN, R.C. R: A language for data analysis and graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, **5**, 299-314, 1996.
- KAMDAR, H.V.; KAMOUN, S. & KADO, C.K. Restoration of pathogenicity of avirulent *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. campestris* pathovars by reciprocal complementation with the *hrpXo* and *hrpXc* genes and identification of HrpX function by sequence analysis. **Journal of Bacteriology**, **175**, 2017-2025, 1993.
- KARZAI, A.W.; ROCHE, E.D. & SAUER, R.T. The SsrA–SmpB system for protein tagging, directed degradation and ribosome rescue. **Nature Structural Biology**, **7**, 449-455, 2000.

- KEEN, N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, **24**, 447-463. 1990.
- KIM, J.F.; WEI, Z-M. & BEER, S.V. *hrpA* and *hrpC* operons of *Erwinia amylovora* encode components of a type III pathway that secretes harpin. **Journal of Bacteriology**, **179**, 1690-1697, 1997.
- KOLLER O.L.; SOPRANO, E. & BONAS, U. **Normas técnicas para a cultura de citros em Santa Catarina**. Sistemas de Produção nº 14. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia de Santa Catarina S.A (EPAGRI), 1993.
- LACORTE, C. β -Glucuronidase (GUS). In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. (Eds.) **Manual de Transformação Genética de Plantas**. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998, 127-141.
- LADY, R.J. & BEER, S.V. Hybridization and function complementation of the *hrp* gene cluster from *Erwinia amylovora* strain Ea321 with DNA of other bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **5**, 412-419, 1992.
- LANG, H. Outer membrane proteins as surface display systems. **International Journal of Medical Microbiology**, **290**, 579–585, 2000.
- LEE, B.M.; PARK, Y.J.; PARK, D.S.; KANG, H.W.; KIM, J.G.; SONG, E.S.; PARK, I.C.; YOON, Y.H.; HAHN, J.H.; KOO, B.S.; LEE, G.B.; KIM, H.; PARK, H.S.; YOON, K.O.; KIM, J.H.; JUNG, C.H.; KOH, N.H.; SEO, J.S & GO, S.J. The genome sequence of *Xanthomonas oryzae pathovar oryzae* KACC10331, the bacterial blight pathogen of rice. **Nucleic Acids Research**, **33**, 577-586, 2005.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. Traduzido por Arnaldo Antonio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi, 3.ed. São Paulo. Editora Sarvier, 2002, 976p.
- LEITE JR, R. P. **Cancro Cítrico: Prevenção e Controle no Paraná**. IAPAR, Londrina, PR, Brasil. 51p. (IAPAR. Circular,61), 1990.

- LEITE JR., R.P.; MOHAN, S.K.; PEREIRA, A.L.G. & AMPACCI, C.A. Controle integrado de cancro cítrico: efeito da resistência genética e da aplicação de bactericidas. **Fitopatologia brasileira**, **12**, 257- 263, 1987.
- LEITE JR., R.P.; EGEL, D.S. & STALL, R.E. Genetic analysis of *hrp*-related DNA sequences of *Xanthomonas campestris* strains causing diseases of citrus. **Applied Environmental Microbiology**, **60**, 1078-1086, 1994.
- LEYNS, F.; DE CLEENE, M.; SWINGS J.G. & DE LEY, J. The host range of the genus *Xanthomonas*. **Botanical Review**, **50**, 308-356, 1984.
- LINDGREN, P.B.; PEET, R.C. & PANOPOULOS, N.J. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* controls pathogenicity on bean plants and hypersensitivity on nonhost plants. **Journal of Bacteriology**, **168**, 512-522, 1986.
- LINDGREN, P.B. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. **Annual Review of Phytopathology**, **35**, 129-152, 1997.
- LINDQUIST, S. & GRAIG, E. A. The heat-shock reponse. **Annual Review of Biochemistry**, **55**, 1151-1191, 1988.
- McPHERSON, J.D. Overgo Probing of High-Density Filters. 2000. Disponível em: <http://www.tree.caltech.edu/protocols/overgo.html>
- MERIGHI, M.; MAJERCZAK, D.R.; STOVER, E.H. & COPLIN, D.L. The HrpX/HrpY two-component system activates *hrpS* expression, the first step in the regulatory cascade controlling the Hrp regulon in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **16**, 238-248, 2003.
- MORAIS, M.C.; ZHANG, W.; BAKER, A.S.; ZHANG, G.; DUNAWAY-MARIANO, D. & ALLEN, K.N. The crystal structure of *Bacillus cereus* Phosphonoacetaldehyde hydrolase: Insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. **Biochemistry**, **39**, 10385-10389, 2000.

- MOREIRA, L. M.; SOUZA, R. F.; ALMEIDA JR., N. F.; SETUBAL, J.C.; OLIVEIRA, J. C. F.; FURLAN, L. R.; FERRO, J. A.; DA SILVA, A. C. R. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. **Annual Review. of Phytopathology**, **42**, 163-184, 2004.
- MUKHOPADHYAY, P.; WILLIAMS, J. & MILLS, M. Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Journal of Bacteriology**, **170**, 5479-5488, 1988.
- NOËL, L.; THIEME, F.; NENNSTIEL, D. & BONAS, U. Two novel type III system-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* are encoded within the *hrp* pathogenicity island. **Journal of Bacteriology**, **184**, 1340-1348, 2002.
- OCCHIALINI, A.; CUNNAC, S.; REYMOND, N.; GENIN, S. & BOUCHER, C. Genome-Wide Analysis of Gene Expression in *Ralstonia solanacearum* Reveals that the *hrpB* Gene Acts as a Regulatory Switch Controlling Multiple Virulence Pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **18**, 938-949, 2005.
- PAGE, F.; ALTABE, S.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N.; LACROIX, J.M.; & BOHIN, J.P. Osmoregulated Periplasmic Glucan Synthesis Is Required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, **183**, 3134-3141, 2001.
- PAO, S.S.; PAULSEN, I. & SAIER Jr., M.H. Major Facilitator Superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **62**, 1-34, 1998.
- PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v.1. 2^a Edição, Makron Books, 1996, 556 p.
- PETNICKI-OCWIEJA, T.; SCHNEIDER, D.J.; TAM, V.C. CHANCEY, S.T.; SHAN, L.; JAMIR, Y.; SCHECHTER, L.M.; JANES, M.D.; BUELL, C.R.; TANG, X.; COLLMER, A. & ALFANO, J.R. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **99**, 7652-7657, 2002.

- PRESTON, G.; HUANG, H.C.; HE, S.Y. & COLLMER, S. The HrpZ proteins of *Pseudomonas syringae* pvs. *Syringae*, *glycinea*, and *tomato* are encoded by an operon containing *Yersinia ysc* homologs an elicit the hypersensitive response in tomato but not soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **8**, 717-732, 1995.
- PRUVOST, O.; HARTUNG, J.S.; CIVEROLO, E.L.; DUBOIS, C. & PERRIER, X. Plasmid DNA fingerprints distinguish pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. **Phytopathology**, **82**, 485-490, 1992.
- R Development Core Team.** R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. 2005. ISBN 3-900051-07-0. <http://www.R-project.org>
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. 2001. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara.
- RAYMOND, K.N. & DERTZ, E.D. (2004). **Biochemical and physical properties of siderophores**. In Iron Transport in Bacteria (Crosa, J. H., Rey, A. R. & Payne, S. M., eds), pp. 3–17, ASM Press, Washington, DC.
- RELMAN, D.A.; DOMENIGHINI, M.; TUOMANEN, E.; RAPPUOLI, R. & FALKOW, S. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: Nucleotide sequence and crucial role in adherence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **86**, 2637-2641, 1989.
- ROSSIER O.; VAN DEN ACKERVEKEN, G. & BONAS, U. HrpB2 and HrpF from *Xanthomonas* are type III-secreted proteins and essential for pathogenicity and recognition by the host plant. **Molecular Microbiology**, **38**, 828-838. 2000.
- SALANOUBAT, M.; GENIN, S.; ARTIGUENAVE, F.; GOUZY, J.; MANGENOT, S.; ARLAT, M.; BILLAULTK, A.; BROTTIER, P.; CAMUS, J.C.; CATTOLICO, L.; CHANDLER, M.; CHOISNE, N.; CLAUDEL-RENARD, C.; CUNNAC, S.; DEMANGE, N.; GASPIN, C.; LAVIE, M.; MOISAN, A.; ROBERT, C.; SAURIN,

W.; SCHIEX, T.; SIGUIER, P.; THEBAULT, P.; WHALEN, M.; WINCKER, P.; LEVY, M.; WEISSENBAACH, J. & BOUCHER, C.A. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. **Nature**, **415**, 497-502, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, R.A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **74**, 5463-5467. 1977.

SCHUBERT, T.S & SUN, X. **Bacterial citrus canker**. Florida Department of Agriculture & Conservancy Services, 6p, (Plant Pathology Circular, 377), 2003.

SCHUBERT, T.S.; RIZVI, S.A.; SUN, X.; GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. & DIXON, W.N. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida-again. **Plant Disease**, **85**, 340-356, 2001.

SCHULTE, R. & BONAS, U. Expression of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* *hrp* gene cluster, which determines pathogenicity and hypersensitivity on pepper and tomato, is plant inducible. **Journal of Bacteriology**, **174**, 815-823, 1992.

SCHOONBEEK, H.J.; Van NISTELROOY, J.G.M. & WAARD, M.A. Functional analysis of ABC transporter genes from *Botrytis cinerea* identifies BcatrB as a transporter of eugenol. **European Journal of Plant Pathology**, **109**, 1003-1011, 2003.

SCHUMMER, M.; Ng, W.; BUMGARNER, R.; NELSON, P.; SCHUMMER, B.; BEDNARSKI, D.; HASSELL, L.; BALDWIN, R.; KARLAN, B. & HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21500 ovarian cDNAs for the discovery of genes overexpressed in ovarian carcinomas. **Gene**, **238**, 375-385, 1999.

SIMPSON, A.J.; REINACH, F.C.; ARRUDA, P.; ABREU, F.A.; ACENCIO, M.; ALVARENGA, R.; ALVES, L.M.; ARAYA, J.E.; BAIA, G.S.; BAPTISTA, C.S.; BARROS, M.H.; BONACCORSI, E.D.; BORDIN, S.; BOVE, J.M.; BRIONES, M.R.; BUENO, M.R.; CAMARGO, A.A.; CAMARGO, L.E.; CARRARO, D.M.; CARRER, H.; COLAUTO, N.B.; COLOMBO, C.; COSTA, F.F.; COSTA, M.C.; COSTA-NETO, C.M.; COUTINHO, L.L.; CRISTOFANI, M.; DIAS-NETO, E.; DOCENA, C.; EL-DORRY, H.; FACINCANI, A.P.; FERREIRA, A.J.; FERREIRA, V.C.; FERRO, J.A.; FRAGA, J.S.; FRANCA, S.C.; FRANCO, M.C.; FROHME, M.; FURLAN, L.R.; GARNIER, M.; GOLDMAN, G.H.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; GRUBER, A.; HO, P.L.; HOHEISEL, J.D.; JUNQUEIRA, M.L.; KEMPER, E.L.; KITAJIMA, J.P.; KRIEGER, J.E.; KURAMAE, E.E.; LAIGRET, F.; LAMBAIS, M.R.; LEITE, L.C.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; LOPES, S.A.; LOPES, C.R.; MACHADO, J.A.; MACHADO, M.A.; MADEIRA, A.M.; MADEIRA, H.M.; MARINO, C.L.; MARQUES, M.V.; MARTINS, E.A.; MARTINS, E.M.; MATSUKUMA, A.Y.; MENCK, C.F.; MIRACCA, E.C.; MIYAKI, C.Y.; MONTERIRO-VITORELLO, C.B.; MOON, D.H.; NAGAI, M.A.; NASCIMENTO, A.L.; NETTO, L.E.; NHANI, A. JR.; NOBREGA, F.G.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, M.A.; DE OLIVEIRA, M.C.; DE OLIVEIRA, R.C.; PALMIERI, D.A.; PARIS, A.; PEIXOTO, B.R.; PEREIRA, G.A.; PEREIRA, H.A.JR.; PESQUERO, J.B.; QUAGGIO, R.B.; ROBERTO, P.G.; RODRIGUES, V. de M.; ROSA, A.J.; De ROSA, V.E.JR.; De SA, R.G.; SANTELLI, R.V.; SAWASAKI, H.E.; Da SILVA, A.C.; Da SILVA, A.M.; Da SILVA, F.R.; Da SILVA, W.A.JR.; Da SILVEIRA, J.F.; SILVESTRI, M.L.; SIQUEIRA, W.J.; De SOUZA, A.A.; De SOUZA, A.P.; TERENCE, M.F.; TRUFFI, D.; TSAI, S.M.; TSUHAKO, M.H.; VALLADA, H.; VAN SLUYS, M.A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; VETTORE, A.L.; ZAGO, M.A.; ZATZ, M.; MEIDANIS, J. & SETUBAL, J.C. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. **Nature**, **406**, 151-157, 2000.

SMYTH, G.K. Limma: linear models for microarray data. In: GENTLEMAN, R.; CAREY, V.; DUDOIT, S.; IRIZARRY, R. & HUBER, W.(eds.). **Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor**. Springer, New York, 2005. p 397-420.

- STAHL, E.A. & BISHOP, J.G. Plant-pathogen arms races at the molecular level. **Current Opinion in Plant Biology**, **3**, 299-304, 2000.
- STASKAWICZ, B.J.; AUSUBEL, F.M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G. & JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, **268**, 661-667. 1995.
- STEINBERGER, E.M. & BEER, S.V. Creation and complementation of pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **1**, 135-144, 1988.
- STERGIOPOULOS, I.; ZWIERS, L.H. & DeWAARD, M.A. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. **European Journal of Plant Pathology**, **108**, 719-734, 2002.
- TAI, Y.C. & SPEED, T.P. A multivariate empirical bayes statistic for replicated microarray time course data. **Annals of Statistics**. No prelo, 2005. Disponível em: <http://astor.som.jhmi.edu/~yuchuan/timecourse.citation.html>.
- THIEME, F.; KOEBNIK, R.; BEKEL, T.; BERGER, C.; BOCH, J.; BÜTTNER, D.; CALDANA, C.; GAIGALAT, L.; GOESMANN, A.; KAY, S.; KIRCHNER, O.; LANZ, C.; LINKE, B.; McHARDY, A.C.; MEYER, F.; MITTENHUBER, G.; NIES, D.H.; NIESBACH-KLÖSGEN, U.; PATSCHKOWSKI, T.; RÜCKERT, C.; RUPP, O.; SCHNEIKER, S.; SCHUSTER, S.C.; VORHÖLTER, F.J.; WEBER, E.; PÜHLER, A.; BONAS, U.; BARTELS, D. & KAISER, O. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. **Journal of Bacteriology**, **187**, 7254-7266, 2005.
- TISCHLER, A.D & CAMILLI, A. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. **Infection and Immunity**, **73**, 5873-5882, 2005.
- TSUGE, S.; FURUTANI, A; FUKUNAKA, R.; OKU, T.; TSUNO, K.; OCHIAI, H.; INOUE, Y.; KAKU, H. & KUBO, Y. Expression of *Xanthomonas oryzae* pv.

- oryzae hrp genes in XOM2, a novel synthetic medium. **Journal of General Plant Pathology**, **68**, 363-371, 2002.
- TSUGE, S.; TERASHIMA, S.; FURUTANI, A.; OCHIAI, H.; OKU, T.; TSUNO, K.; KAKU, H. & KUBO, Y. Effects on promoter activity of base substitutions in the *cis*-acting regulatory element of HrpXo regulons in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, **187**, 2308-2314, 2005.
- VAN GIJSEGEN, F.; GENIN, S. & BOUCHER, C.A. Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. **Trends Microbiology**, **1**, 175-180, 1993.
- VAN GIJSEGEM, F.; GOUGH, C.; ZISCHEK, C.; NIQUEUX, E.; ARLAT, M.; GENIN, S.; BARBERIS, P.; GERMAN, S.; CASTELLO, P.; BOUCHER, C. The *hrp* gene locus of *Pseudomonas solanacearum*, which controls the production of a type III secretion system, encodes eight proteins related to components of the bacterial flagellar biogenesis complex. **Molecular Microbiology**, **15**, 1095-1114, 1995.
- VERMEULEN, T.; SCHOONBEEK, H.; & DeWAARD, M.A. The ABC transporter BcatrB from *Botrytis cinerea* is a determinant of the activity of the phenylpyrrole fungicide fludioxonil. **Pest Management Science** **57**: 393-402, 2001.
- VERNIÈRE, C.; HARTUNG, J.S.; PRPUVOST, O.P.; CIVEROLO, E.L.; ALVAREZ, A.M.; MAESTRI, P. & LUISETTI, J. Characterization of phenotypically distinct strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* from Southwest Asia. **European Journal Plant Pathology**, **104**, 477-487, 1998.
- WANDERSMAN, C. & DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annual Review. Microbiology**, **58**, 611-647, 2004.
- WENGELNIK, K. & BONAS, U. HrpXv, na AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Journal of Bacteriology**, **178**, 3462-3469, 1996.

- WENGELNIK, K.; Van den ACKERVEKEN, G. & BONAS, U. HrpG, a key *hrp* regulatory protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is homologous to two-component response regulators. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **9**, 704-712, 1996a.
- WENGELNIK, K.; MARIE, C.; RUSSEL, M.; BONAS, U. Expression and localization of HrpA1, a protein of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* essential for pathogenicity and induction of the hypersensitive reaction. **Journal of Bacteriology**, **178**, 1061-1069, 1996b.
- WEST, A.H. & STOCK, A.M. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. **Trends in Biochemical Sciences**, **26**, 369-376, 2001.
- WHALEN, M.C.; WANG, J.F.; CARLAND, F.M.; HEISKEL, M.E.; DAHLBECK, D.; MINSAVAGE, G.V.; JONES, J.B.; SCOTT, J.W.; STALL, R.E. & STASKAWICZ, B.J. Avirulence gene *avrRxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Haubii 7998. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, **6**, 616-627, 1993.
- WHITE, F.F.; YANG, B. & JOHNSON, L.B. Prospects for understanding avirulence gene function. **Current Opinion in Plant Pathology**, **3**, 291-298, 2000.
- WOOD, D.W.; SETUBAL, J.C.; KAUL, R.; MONKS, D.E.; KITAJIMA, J.P.; OKURA, V.K.; ZHOU, Y.; CHEN, L.; WOOD, G.E.; ALMEIDA, N.F.Jr.; WOO, L.; CHEN, Y.; PAULSEN, I.T.; EISEN, J.A.; KARP, P.D.; BOVEE Sr., D.; CHAPMAN, P.; CLENDENNING, J. DEATHERAGE, G.; GILLET, W.; GRANT, C.; KUTYAVIN, T.; LEVY, R.; LI, M.J.; McCLELLAND, E.; PALMIERI, A.; RAYMOND, C.; ROUSE, G.; SAENPHIMMACHAK, C.; WU, Z.; ROMERO, P.; GORDON, D.; ZHANG, S.; YOO, H.; TAO, Y.; BIDDLE, P.; JUNG, M.; KRESPAN, W.; PERRY, M.; GORDON-KAMM, B.; LIAO, L.; KIM, S.; HENDRICK, C.; ZHAO, Z.Y.; DOLAN, M.; CHUMLEY, F.; TINGEY, S.V.; TOMB, J.F.; GORDON, M.P.; OLSON, M.V.; NESTER, E.W. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. **Science**, **294**, 2317-2323, 2001.

- XIAO, Y.; HEU, S.; YI, J.; LU, Y. & HUTCHESON, S.W. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. **Journal of Bacteriology**, **176**, 1025-1036, 1994.
- XIAO, Y. & HUTCHESON, S.W. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. **Journal of Bacteriology**, **176**, 3089-3091, 1994.
- ZHAO, N.; NASHIDA, H.; TAKAHASHI, N.; MISUMI, Y. & SAKAKI, Y. High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. **Gene**, **156**, 207-213, 1995.
- ZHU, W.M.; MAGBANUA, M.M. & WHITE, F.F. Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, **182**, 1844-1853, 2000.
- ZWIERS, L.H.; STERGIOPOULOS, I.; GIELKENS, M.M.; GOODALL, S.D. & DeWAARD, M.A. ABC transporters of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* function as protectants against biotic and xenobiotic toxic compounds. **Molecular Genetics and Genomics**, **269**, 499-507, 2003.