

SUSAN IENNE DA SILVA VANÇAN

PHYTOMONAS SERPENS:
CARACTERIZAÇÃO DA PIRUVATO/INDOLPIRUVATO
DESCARBOXILASE E FUNCIONALIDADE DA
AUXINA PRODUZIDA

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Bianca S. Zingales

Versão original.

São Paulo
2012

RESUMO

lenne, S. *Phytomonas serpens*: Caracterização da piruvato/indolpiruvato descarboxilase e funcionalidade da auxina produzida. [Tese (Doutorado em Parasitologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Entre os tripanossomatídeos, o gênero *Phytomonas* está especificamente adaptado a infectar plantas. Evidências indicam que a produção de ATP de *Phytomonas* spp deriva principalmente da glicólise (fosforilação no nível do substrato), tendo em vista que o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória não são funcionais neste gênero. A sequência-consenso de um agrupamento de Etiquetas de Sequências Transcritas (ESTs) de *P. serpens* apresentou altos índices de similaridade com sequências proteicas de indolpiruvato descarboxilases (IPDCs) de fitobactérias, piruvato descarboxilases (PDCs) de fungos e PDC/IPDCs putativas de *Leishmania* spp. A PDC converte piruvato a acetaldéido, passo chave que conecta a glicólise à fermentação alcoólica, enquanto que a IPDC participa da biossíntese de um dos principais hormônios vegetais, o ácido indol-3-acético (AIA), convertendo indolpiruvato a indol-3-acetaldeído. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar o gene *PDC/IPDC* de *P. serpens*, investigar sua possível origem e avaliar as atividades PDC e IPDC neste organismo. A conservação da sequência do gene *PDC/IPDC* foi verificada em 14 isolados de *Phytomonas* analisados. Em *P. serpens*, o gene está presente em pelo menos seis cópias em tandem. Análises filogenéticas mostram que a proteína de *P. serpens* é robustamente monofilética com as enzimas de *Leishmania* spp. e *Crithidia fasciculata*, clado grupo-irmão de IPDCs de gama-proteobactérias, sugerindo um evento de transferência horizontal gênica de uma fitobactéria doadora para um tripanossomatídeo ancestral não-*Trypanosoma*. Não foram encontrados genes ortólogos nos genomas de *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, enquanto que possíveis ortólogos estariam presentes nos gêneros *Leishmania*, *Herpetomonas* e *Crithidia*. A análise de meios de cultura condicionados de *P. serpens* permitiu correlacionar a adição de glicose com o aumento no teor do principal produto da fermentação alcoólica, etanol. A quantificação de AIA e precursores também mostrou uma correlação direta entre a adição de triptofano, precursor da biossíntese de AIA, e o aumento na quantidade do fitormônio e seu intermediário, triptofol. A funcionalidade do AIA presente no meio condicionado foi confirmada em ensaios de alongamento de hipocótilos de tomates Micro-Tom. A quantificação de AIA no pericarpo de tomates inoculados com *P. serpens* mostrou um aumento significativo na quantidade de AIA conjugado (amida e éster) nos frutos, sugerindo que o tripanossomatídeo esteja contribuindo com o pool do fitormônio, e que o excesso de auxina seria conjugado possivelmente para evitar o comprometimento da viabilidade do fruto. A atividade PDC foi avaliada em extratos de *P. serpens* e na enzima PDC/IPDC recombinante, revelando uma K_M para piruvato de 1,4 mM (extratos) e 2,4 mM (enzima recombinante). Indolpiruvato age como inibidor competitivo da atividade PDC, elevando a K_M tanto nos extratos quanto na enzima recombinante. Dados preliminares indicam atividade IPDC em extratos e bactérias recombinantes, com a formação de indol-3-acetaldeído. Concluímos que a PDC/IPDC seria uma 2-cetoácido descaboxilase, com atividade catalítica variável para diferentes substratos, por exemplo, piruvato e indolpiruvato. A atividade PDC parece ser predominante em *P. serpens*, permitindo sua

sobrevivência no meio rico em carboidratos do hospedeiro vegetal, conferindo ao flagelado uma rota alternativa e necessária para a re-oxidação de parte do NADH produzido na via glicolítica.

Palavras-chave: *Phytomonas*. Piruvato/indolpiruvato descarboxilase. Transferência Horizontal Gênica. Ácido indol-3-acético.

ABSTRACT

lenne, S. *Phytomonas serpens*: Characterization of the pyruvate/indolepyruvate decarboxylase and functionality of the auxin produced. [PhD thesis (Parasitology)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

Among trypanosomatids, the genus *Phytomonas* is specifically adapted to infect plants. Evidence indicates that ATP production in *Phytomonas* spp. derives mainly from glycolysis (substrate level phosphorylation), since the Krebs cycle and the cytochrome-mediated respiratory chain are non-functional in this genus. The consensus sequence of one Expressed Sequence Tag (EST) cluster of *P. serpens* showed high similarity with protein sequences of indolepyruvate decarboxylases (IPDCs) of phytobacteria, pyruvate decarboxylases (PDCs) of fungi and putative PDC/IPDCs of *Leishmania* spp. PDC converts pyruvate to acetaldehyde, a key step that connects glycolysis to fermentation, whereas IPDC participates in the biosynthesis of the major plant hormone, indol-3-acetic acid (IAA), converting indolepyruvate to indol-3-acetaldehyde. The goals of this study were to characterize *P. serpens* PDC/IPDC gene, investigate the possible origin of the gene and evaluate PDC and IPDC activities in this organism. The conservation of the PDC/IPDC gene sequence was observed in 14 analysed *Phytomonas* isolates. In *P. serpens* the gene is present in at least six copies in tandem. Phylogenetic analyses showed that *P. serpens* protein is robustly monophyletic with *Leishmania* spp. and *Crithidia fasciculata* enzymes, a sister-group clade of gamma-proteobacteria IPDCs, suggesting a horizontal gene transfer event from a donor phytobacteria to a non-*Trypanosoma* trypanosomatid ancestor. No orthologous genes were found in *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* genomes, whereas potential orthologs are present in the genera *Leishmania*, *Herpetomonas* and *Crithidia*. Analysis of *P. serpens* conditioned culture media allowed us to correlate glucose addition to increased amounts of the fermentation main product, ethanol. Quantification of IAA and its precursors also showed a direct correlation between the concentration of tryptophan, precursor of IAA biosynthesis, and the levels of the phytohormone and its intermediary, tryptophol. The functionality of IAA produced *in vitro* was confirmed in bioassays of Micro-Tom hypocotyl elongation response. In the pericarp of tomatoes inoculated with *P. serpens* we verified an increase of conjugated IAA (ester and amide), suggesting that the trypanosomatid contributes to the fruit phytohormone pool, and that the excess of auxin is conjugated to avoid compromising the fruit viability. PDC activity was measured in *P. serpens* extracts and in the PDC/IPDC recombinant enzyme, showing a K_M for pyruvate of 1.4 mM (extracts) and 2.4 mM (recombinant enzyme). Indolepyruvate acts as a competitive inhibitor of the PDC activity, increasing the K_M both in the extracts and recombinant enzyme. Preliminary data indicate IPDC activity in extracts and recombinant bacteria with the formation of indol-3-acetaldehyde. We concluded that *P. serpens* PDC/IPDC could be a 2-ketoacid decarboxylase with variable catalytic activity for different substrates, such as pyruvate and indolepyruvate. PDC activity seems to be prevalent in *P. serpens*, allowing the flagellate survival in the carbohydrate-rich medium of the host plant by providing an alternative and necessary route to re-oxidate part of the NADH produced in the glycolytic pathway.

Key words: *Phytomonas*. Pyruvate/indolepyruvate decarboxylase. Horizontal Gene Transfer. Indole-3-acetic acid

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Phytomonas*

1.1.1 O Gênero *Phytomonas*

O gênero *Phytomonas* pertence à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. Esta ordem abrange organismos que apresentam um ou dois flagelos que se originam da bolsa flagelar, e uma estrutura bastante peculiar, o cinetoplasto, que corresponde a uma região de DNA condensado localizada no interior de uma mitocôndria única que se ramifica por toda a célula (Camargo, 1999). A ordem Kinetoplastida inclui patógenos de diferentes grupos de invertebrados, vertebrados e plantas, e a adaptação ao hospedeiro pode ter sido o principal mecanismo para sua evolução (Hamilton et al., 2007).

A descoberta de tripanossomatídeos em vegetais ocorreu em 1909, com a identificação de flagelados no látex de *Euphorbia pilulifera* denominados *Leptomonas davidi* por Lafont (Jankevicius et al., 1988). No mesmo ano, Donovan propôs o gênero *Phytomonas* para agrupar tripanossomatídeos parasitas de vegetais (Jankevicius et al., 1988). No entanto, esta denominação passou a ser aceita cerca de 70 anos mais tarde. Até então os flagelados de plantas eram referidos como *Leptomonas*, *Herpetomonas* e até mesmo *Trypanosoma* (Camargo, 1999).

A definição de *Phytomonas* de Donovan era artificial, uma vez que outros tripanossomatídeos de insetos, tais como *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas*, também haviam sido isolados de plantas (Conchon et al., 1989). Desta forma, a classificação de organismos baseada apenas no hospedeiro de origem é falha (Conchon et al., 1989; Dollet et al., 2011). Embora os isolados de *Phytomonas* apresentem características verificadas ao microscópio de transmissão eletrônica, tais como arranjo peculiar dos ribossomos, cisternas endoplasmáticas e presença de corpos elétron-densos no citoplasma, essas características não são suficientes para diagnosticar um parasita como pertencente ao gênero *Phytomonas* (Camargo, 1999). Logo, o tipo de hospedeiro e os caracteres de morfo-desenvolvimento não permitem a correta distinção do gênero *Phytomonas* de outros tripanossomatídeos

(Camargo, 1999). Mais recentemente marcadores moleculares vêm se popularizando na identificação do gênero (ver abaixo).

1. 1. 2 Transmissão e Patogenicidade

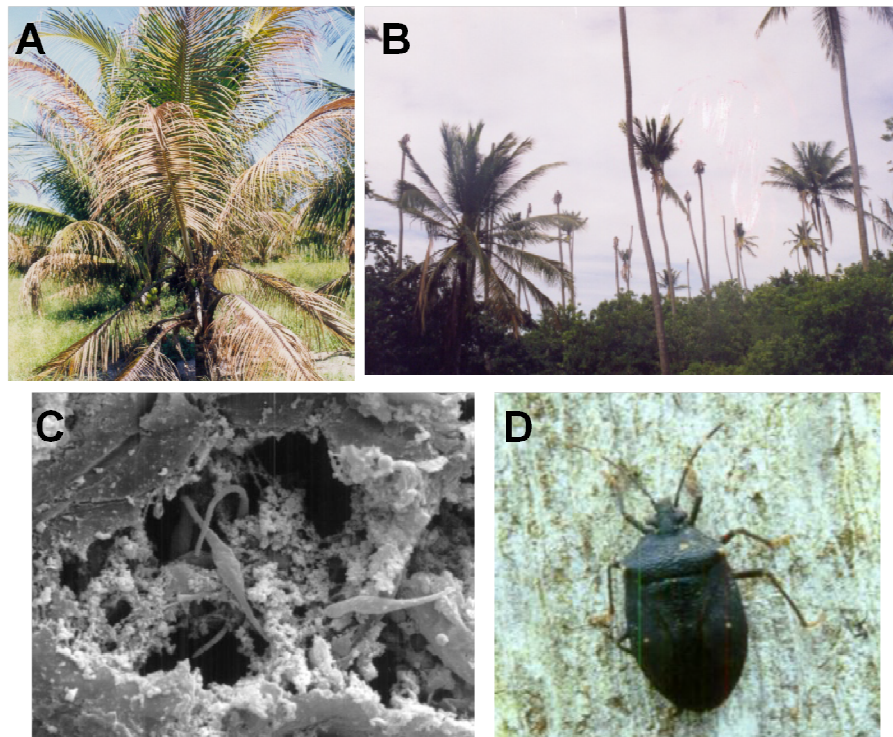
O ciclo de vida de *Phytomonas* é dixênico, envolvendo insetos fitófagos que agem como vetores na transmissão mecânica das formas promastigotas para os diferentes hospedeiros vegetais (Jankevicius et al., 1989; Canepa et al., 2007). Os vetores descritos pertencem à ordem Hemiptera, sendo os insetos das famílias Coreidae, Pentatomidae e Lygaeidae os principais candidatos (Dollet, 1984; Sbravate et al., 1989).

A comunidade científica começou a ter um interesse especial no gênero *Phytomonas* ao constatar que estes organismos causavam enfermidades devastadoras em plantações de interesse econômico, tais como mandioca (“chochamento das raízes”), café (necrose do floema), coco (“*hartrot*”) e palmeiras produtoras de óleo (“*marchitez sorpressiva*”), principalmente na América Latina (Dollet, 1984). Por outro lado, foi verificado que outros vegetais infectados por *Phytomonas*, tais como tomate e batata, não apresentavam nenhum dano aparente (Mcghee e Cosgrove, 1980; Camargo et al., 1990; Sánchez-Moreno et al., 1995; Camargo, 1999). Esta diferença intrigante foi relacionada com o tipo de tecido do hospedeiro onde os flagelados se concentravam. Desta forma, os tripanossomatídeos que infectam plantas são classificados em:

- lactícolas: presentes no látex de várias plantas, especialmente de Euphorbiaceae e Asclepiadaceae (Dollet, 1984; Camargo et al., 1990). Nestes vegetais, os isolados não são patogênicos, com exceção de *P. francai*, encontrada em mandioca (*Manihot esculenta*) (Kitajima et al., 1986; Vainstein e Roitman, 1986; Miranda et al., 2004);
- frutícolas: encontrados na polpa e nas sementes de frutos de diversas famílias. Não se sabe se são parasitas dos frutos ou apenas invasores oportunistas, pois, na maioria dos frutos, poucos flagelados são detectados (Jankevicius et al., 1989; Camargo et al., 1990; Vickerman, 1994). Uma exceção é *P. serpens*, extremamente abundante na polpa de tomates, sem, no entanto, promover patogênese (Jankevicius et al., 1989; Camargo et al., 1990);

- floemícolas: presentes no floema de plantas não lactíferas; como coco, café e palmeiras produtoras de óleo. Os isolados são patogênicos, causando murchamento/definhamento (necrose do floema; Figura 1) (Dollet, 1984; Vickerman, 1994; Camargo, 1999);
- florícolas: presentes em flores e inflorescências. Foram descritos em poucas espécies vegetais (Camargo, 1999) e aparentemente não causam patogênese.

Figura 1 - Necrose do floema, causada por *P. staheli*, em coqueiral.



A: primeiros sintomas de um coqueiro atacado por *Phytomonas*: empardecimento e ressecamento da folhagem. B: doença disseminada em coqueiral: sintoma conhecido como “poste-de-telefone”. C: *P. staheli* no floema de coqueiro (x 3.500 - fotografia de Flavio C. Miguens - Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF). D: percevejo vetor adulto, *Lincus lobuliger*.

FONTE: A e B: Reprodução de Warwick (2005); C e D: Reprodução de CEPLAC¹ e Sgrillo et al. (2005).

Em resumo, apenas *Phytomonas* encontradas no floema estariam associadas com uma patogênese severa (Camargo et al., 1990; Vickerman, 1994; Uttaro et al., 1997; Camargo, 1999; Dollet et al., 2001a). Entretanto, a classificação baseada

¹ Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/FITOMONAS%20NO%20COQUEIRO.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2012.

apenas no tecido do hospedeiro onde o flagelado é encontrado parece insuficiente, conforme indicam dados bioquímicos e moleculares de caracterização desses tripanossomatídeos, como veremos a seguir.

1. 1. 3 Identificação de gênero e espécie

Os primeiros estudos de biologia molecular em fitoflagelados visavam a taxonomia e o diagnóstico (Hollar e Maslov, 1997; Serrano et al., 1999). Desta forma, foram caracterizados predominantemente genes de múltiplas cópias, tais como a sequência do gene de mini-exon ou *spliced leader* (SL) *gene* (Teixeira et al., 1996; Serrano et al., 1999; Dollet et al., 2001b), genes de RNA ribossômico (Dollet et al., 2000) e os minicírculos do kDNA (Dollet et al., 2001a).

Anticorpos monoclonais foram desenvolvidos na tentativa de distinguir espécies de *Phytomonas* de outros tripanossomatídeos, porém, nem todas as espécies de *Phytomonas* reagem igualmente com os anticorpos utilizados (Petry et al., 1989; Teixeira e Camargo, 1989). Em 1996, o grupo de Teixeira desenvolveu um teste para confirmar a real existência do gênero baseado na hibridização de DNA genômico com uma sonda específica (SL3') complementar à sequência SL (Teixeira et al., 1996). Três anos mais tarde, o mesmo grupo desenvolveu uma PCR baseada em regiões que flanqueiam a sequência SL3', amplificando um fragmento de DNA específico de *Phytomonas*, facilitando o diagnóstico do gênero (Camargo, 1999; Serrano et al., 1999).

Como visto no item anterior, a identificação do gênero é insuficiente no contexto de estudos epidemiológicos de doenças de importância agrícola, sendo necessária a compreensão da relação entre o tripanossomatídeo e sua localização em determinado hospedeiro (Batistoti et al., 2001; Dollet et al., 2001a; Dollet et al., 2011). Assim, ferramentas para a definição de espécies dentro do gênero *Phytomonas* ou para a identificação de populações começaram a ser desenvolvidas e avaliadas.

Diferentes marcadores moleculares permitiram a separação de um grupo de isolados floemícolas patogênicos de palmeiras de grupos de isolados não-patogênicos de outros vegetais, permitindo uma distinção dos organismos causadores de doenças em palmeiras. Dentre os marcadores cita-se a análise da sequência do gene da subunidade menor do RNA ribossômico (SSU rRNA) (Marché

et al., 1995); o padrão de isoenzimas (Guerrini et al., 1992; Muller et al., 1994); RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (Muller et al., 1997); RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) (Muller et al., 1995) e análise da sequência SL (Dollet et al., 2001a) e de minicírculos de kDNA (Sturm et al., 2007).

A classificação por sequências de genes de RNA ribossômico 5S indicou que o espectro de *Phytomonas* spp. era composto por pelo menos oito grupos (grupos A a I) (Dollet et al., 2000). Dados mais recentes, baseados na análise das sequências do gene do RNA ribossômico 5,8S e das regiões ITSs (*Internal Transcribed Spacers* - Espaçadores internos transcritos) e de microssatélites (Dollet et al., 2011) apontam para a existência de pelo menos dez grupos (grupos A a J).

Estas análises mostram que os isolados floemícolas formam um grupo bastante homogêneo (grupo H) que se diferencia dos demais agrupamentos heterogêneos de isolados de látex e de frutos e de tripanossomatídeos de insetos (Sturm et al., 2007). No entanto, nenhum critério objetivo foi estabelecido para a classificação das espécies dentro de *Phytomonas*.

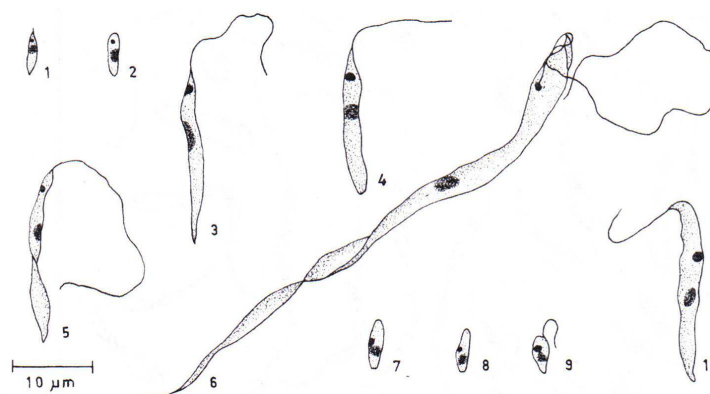
1. 1. 4 Biologia de *Phytomonas serpens* e a importância de estudos centrados nesta espécie

Em 1957, foram descobertos flagelados na polpa de tomates na África do Sul, denominados *Leptomonas serpens* por Gibbs (Gibbs, 1957 *apud* Jankevicius et al., 1989). Sua denominação foi alterada posteriormente por Podlipaev para *Phytomonas serpens* (Podlipaev, 1986 *apud* Jankevicius et al., 1989). Devido à possibilidade de cultivo *in vitro*, conseguiu-se fechar o ciclo biológico de *P. serpens* em insetos e plantas em condições laboratoriais, observando-se elevado polimorfismo (Figura 2) (Jankevicius et al., 1988, 1989).

Os estudos mostraram que apenas tomates maduros eram infectados com sucesso por *P. serpens* (Jankevicius et al., 1988). Os autores sugeririam que a não infecção de tomates em fase de maturação estaria associada à presença de fitoalexinas (tomatina ou tomaditina) e receptores de superfície que funcionam como defesa contra a invasão de microorganismos. Estes componentes têm expressão reduzida ou ausente no fruto maduro. Jankevicius et al. (1988, 1989) concluíram

haver pelo menos dois vetores (*Phthia picta* e *Nezara viridula*) transmissores de *P. serpens* em tomate, que transmitiriam os flagelados para a polpa do tomate através da saliva.

Figura 2 - Polimorfismo de *Phytomonas serpens*, parasita de tomate.



1 e 2, formas de seiva do fruto; 3 e 4, flagelados de meio bifásico ágar-sangue/LIT; 5 e 6, formas alongadas de fase estacionária de meio de cultura LIT; 7 e 8, formas não-flageladas de urina de vetores hemípteros; 9 e 10, flagelados do trato digestivo de vetor.

FONTE: Camargo (1999), modificado de Jankevicius et al. (1989).

A observação de que o soro de pacientes com doença de Chagas apresentava alta reatividade com antígenos de *P. serpens* levou o grupo do Dr. J. V. Jankevicius a investigar a natureza dos antígenos de *P. serpens* que apresentavam reatividade cruzada com *T. cruzi* (Breganó et al., 2003). O grupo verificou que antígenos de superfície do fitoflagelado induzem uma imunidade protetora em camundongos, protegendo-os parcialmente contra um desafio com *T. cruzi* (Breganó et al., 2003; Pinge-Filho et al., 2005; Graça-de Souza, et al., 2010). Com base nestes resultados, foi sugerido que a imunização oral com um tripanossomatídeo de plantas, não-patogênico para o homem, poderia representar uma vacina contra a doença de Chagas.

Foi verificado posteriormente que outros tripanossomatídeos de insetos e de plantas, incluindo *Phytomonas* spp., compartilham com *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp. a metaloprotease de superfície gp63 (Santos et al., 2006). Além desta enzima, uma ferro superóxido dismutase de *Phytomonas* spp. também apresenta epitopos de reação cruzada com tripanossomatídeos patogênicos (Quesada et al., 2001; Marín et al., 2004, 2006).

1. 1. 5 Metabolismo

Adaptações metabólicas profundas são esperadas para permitir que *Phytomonas* prospere em ambientes tão díspares como floema e látex de plantas hospedeiras e tubos digestivos de insetos vetores. Algumas características do metabolismo de *Phytomonas* foram investigadas em maior detalhe no isolado de tomate *P. serpens*, devido à facilidade de cultivo *in vitro* (Jankevicius et al., 1989). Dentre estas características, o aspecto mais marcante foi a observação de que vários genes da cadeia respiratória estão ausentes do genoma da mitocôndria, afetando funções mitocondriais como a respiração mediada por citocromo e a produção de ATP (Maslov et al., 1999; Nawathean e Maslov, 2000; González-Halphen e Maslov, 2004). Também foi relatado que a produção de ATP deriva principalmente da glicólise, tendo em vista que o ciclo de Krebs aparentemente não é funcional (Sánchez-Moreno et al., 1992). A excreção de enzimas envolvidas na degradação do amido em di- e monossacarídeos e de enzimas que degradam celulose e pectina (Sanchez-Moreno et al., 1992), bem como a concentração elevada de glicosomas, que compartimentalizam as enzimas da via glicolítica (Sánchez-Moreno et al., 1992), são evidências que reforçam a adaptação de *Phytomonas* ao meio rico em carboidratos do hospedeiro vegetal.

Pouco se conhece sobre o metabolismo de *Phytomonas* nos insetos vetores, mas postula-se que os aminoácidos seriam a principal fonte de energia (Molinas et al., 2003; González-Halphen e Maslov, 2004), dada sua disponibilidade no hospedeiro. Entretanto, Canepa et al. (2007) mostraram que em *Phytomonas* sp. o transporte de glicose e frutose é muito mais eficiente que o de aminoácidos, o que reforça a sugestão de que os requerimentos energéticos destes organismos seriam dependentes da fosforilação em nível do substrato que ocorre na via glicolítica.

1. 1. 5 Genômica e a identificação da sequência objeto desta Tese

Há uma escassez de informações referentes à genômica e proteômica de membros do gênero *Phytomonas*. Como um primeiro passo na definição do genoma de *Phytomonas*, foi caracterizado o cariótipo molecular de isolados de látex e do grupo H (floemícolos) (Marín et al., 2008; 2009). Mais recentemente, foi sequenciado pela técnica de pirosequenciamento o genoma de *Phytomonas* sp. isolada de

Jatropha macrantha (TCC 066E). No entanto os dados ainda não estão disponíveis ao público (Alves et al., 2011).

Há alguns anos, com o intuito de expandir o conhecimento básico sobre a biologia e metabolismo de *Phytomonas*, nosso grupo, em colaboração com o grupo do Dr. Antonio Gonzalez (Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Espanha) e do Dr. Georgios Pappas Júnior (Universidade Católica de Brasília, UCB, Brasil), gerou, sequenciou e analisou 2.190 etiquetas de sequências transcritas (ESTs) de uma biblioteca de cDNA de *P. serpens* (Pappas et al., 2005). Após a formação de agrupamentos, as categorias funcionais das sequências-consenso foram designadas. À época, cerca de 36% das sequências não apresentaram precedentes, ao passo que as restantes apresentaram similaridade com enzimas de várias vias metabólicas, proteínas implicadas em processos de tradução, biogênese e estrutura ribossômica, modificações pós-transducionais, *turnover* de proteína e chaperonas, transporte de carboidratos, dentre outros (Pappas et al., 2005).

O agrupamento mais populoso de *P. serpens* continha 45 ESTs homólogas a membros da família de transportadores de glicose (Pappas et al., 2005). Este achado pode ser diretamente correlacionado com a adaptação de *Phytomonas* ao ambiente rico em carboidratos das plantas hospedeiras e sua dependência da produção de ATP a partir da glicólise, conforme descrito acima.

A sequência-consenso (540 nucleotídeos) de um dos agrupamentos de ESTs de *P. serpens*, resultantes do trabalho de Pappas e colaboradores (2005), apresentou os maiores índices de similaridade de sequência no nível de aminoácido com indolpiruvato descarboxilases (IPDCs) de fitobactérias, com enzimas dependentes de tiamina pirofosfato (TPP) e com uma putativa piruvato/indolpiruvato carboxilase de *L. major*.

A sequência completa do gene da putativa IPDC de *P. serpens*, representada por 2.364 pb, sendo 1.647 pb correspondentes à fase aberta de leitura (ORF), foi obtida por nós (Ienne et al., 2012) e a busca pelo programa BLAST X no banco de dados não reduntante (*nr, non redundant*) do NCBI utilizando como entrada (*query*) a sequência nucleotídica completa (2.364 pb) confirmou a elevada similaridade com enzimas dependentes de TPP (Tabela 1) e as putativas enzimas de *Leishmania*.

Tabela 1 - Lista das dez primeiras sequências com maior similaridade com a sequência nucleotídica completa de *PDC/IPDC* de *P. serpens* obtidas por BLAST X (*translated query versus protein database*) contra o banco de dados *nr* de sequências nucleotídicas traduzidas do NCBI, ranqueadas pelo *bit-score* do alinhamento.

Número de Acesso no GenBank	Descrição da sequência	E-value	Bit-score	Identidade	Similaridade
XP_001564563	pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904] ^a	6e-137	493	46	61
XP_001686429	pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania major</i> strain Friedlin] ^a	1e-136	492	47	62
XP_001468661	pyruvate/indole-pyruvate carboxylase [<i>Leishmania infantum</i> JPCM5] ^a	4e-136	490	47	61
ZP_06639356	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Serratia odorifera</i> DSM 4582]	2e-130	471	44	62
ZP_06191191	thiamine pyrophosphate binding domain-containing protein [<i>Serratia odorifera</i> 4Rx13]	2e-130	471	45	64
CAX60783	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Erwinia billingiae</i> Eb661]	2e-128	464	46	64
YP_001479638	thiamine pyrophosphate binding domain-containing protein [<i>Serratia proteamaculans</i> 568]	9e-128	462	44	63
AAB06571	Indolepyruvate decarboxylase [<i>Pantoea agglomerans</i>]	2e-126	457	45	62
YP_051693	indole-3-pyruvate decarboxylase [<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCR11043]	2e-126	457	45	60
YP_001005545	indole-3-pyruvate decarboxylase [<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081]	8e-126	456	44	60

^a Como será discutido no texto, a designação correta da enzima de *Leishmania* deveria ser piruvato/indolpiruvato **descarboxilase**.

FONTE: Adaptado de lenne et al., 2012.

As três primeiras entradas correspondem às putativas piruvato/indolpiruvato **carboxilases** de *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*, ao passo que outras entradas correspondem a **descarboxilases** e proteínas com domínio de TPP (ver Tabela 1). O fato de encontrarmos acertos com carboxilases e descarboxilases nos causou estranheza, uma vez que as carboxilases têm como cofator biotina, ao passo que a descarboxilases têm como cofator TPP. Ao fazer a análise dos domínios das putativas enzimas de *Leishmania* com o programa PFAM (Bateman et al., 2004) (*site*: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>), observamos a presença de domínios para TPP, indicando tratarem-se de descarboxilases e não de carboxilases. Desta forma, a designação equivocada das enzimas de *Leishmania* sp. provavelmente é decorrente da anotação automática, usual em projetos Genoma.

Outro ponto que nos chamou a atenção foi não termos encontrado genes ortólogos às enzimas putativas de *Leishmania* spp. nos genomas de *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, ao contrário do que ocorre para muitos genes que são conservados nestes tripanossomatídeos (El-Sayed et al., 2005).

Na Tabela 1 nota-se que as entradas que apresentam elevada similaridade com a sequência proteica de *P. serpens* correspondem a indolpiruvato descarboxilases e enzimas dependentes de TPP de bactérias dos gêneros *Pantoea*, *Erwinia* e *Pectobacterium*. Estas bactérias, comumente encontradas na superfície de plantas (Brandl et al., 1996; Brandl e Lindow, 1997, 1998; Brandl et al., 2001), pertencem à classe Gammaproteobacteria - família Enterobacteriaceae.

1. 2 Transferência Horizontal Gênica

Múltiplos eventos de transferência horizontal gênica (THG) têm sido implicados na aquisição de peculiaridades estruturais e bioquímicas dos tripanossomatídeos, o que permitiu a adaptação destes organismos a uma vasta gama de hospedeiros (Opperdoes e Michels, 2007). O sucesso adaptativo destes organismos, atestado por sua complexidade metabólica e organizacional, só teria sido possível graças à aquisição de um grande número de genes a partir de ancestrais doadores representados por vírus, bactérias, cianobactérias endossimbiontes e bactérias não-fototróficas, por exemplo, residentes no intestino do inseto hospedeiro (Opperdoes e Michels, 2007).

Hannaert et al. (2003) reportam uma coleção de genes de tripanossomas que apresentam similaridade com genes de plantas e de procariotos. Muitos destes genes estão envolvidos no metabolismo de carbono, biossíntese de ácidos graxos e aminoácidos aromáticos, metabolismo do glicerol, proteção contra espécies reativas de oxigênio, respiração e bombeamento de prótons (Hannaert et al., 2003; Waller et al., 2004). Por exemplo, dados dos projetos genoma de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* indicam que estes organismos possuem muitos genes codificadores de quinases de açúcares, cujos produtos estariam localizados em glicossomas (Berriman et al., 2005). A presença de tantas quinases específicas para açúcares diferentes da glicose provavelmente reflete uma adaptação precoce voltada para fontes ricas em carboidratos presentes nos hospedeiros vetores e em plantas (Opperdoes e Michels, 2007). Esta adaptação pode ter sido facilitada por múltiplos eventos de THG entre

bactérias (endo)simbiontes presentes tanto no intestino do inseto quanto no próprio parasita (Oppendoes e Michels, 2007; Kořený et al., 2010; Alves et al., 2011). De fato, os tripanossomatídeos parasitam uma grande variedade de insetos com diferentes hábitos alimentares. Como exemplos citam-se as espécies de *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas* que podem não apenas habitar o intestino de uma variedade de insetos, mas também são capazes de estabelecer infecções transitórias em plantas (Catarino et al., 2001), e *Phytomonas* spp., que alternam o ciclo entre insetos e plantas hospedeiras.

O fato de o gene da putativa piruvato ou indolpiruvato descarboxilase (PDC/IPDC) de *P. serpens* apresentar elevada similaridade com IPDCs e enzimas dependentes de TPP de fitobactérias sugere que este gene também poderia ter sido adquirido por transferência horizontal.

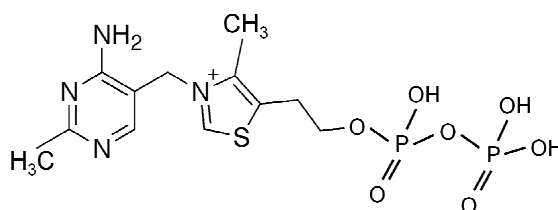
A hipótese de THG já havia sido levantada anteriormente para a aquisição do gene de *Phytomonas* que codifica uma isopropil álcool desidrogenase (iPDH) (Molinas et al., 2003). A partir de análises filogenéticas, os autores verificaram que a sequência do gene de iPDH de *Phytomonas* sp. comporta-se de forma monofilética com o clado de álcool desidrogenases (ADH) de *Mycoplasma penetrans* e de várias proteobactérias (Molinas et al., 2003). A análise da sequência proteica e das propriedades cinéticas da iPDH de *Phytomonas* sp. e da ADH da proteobactéria *Ralstonia eutropha* levou os autores a postular que a enzima iPDH apareceu no gênero *Phytomonas* como resultado de um processo de THG entre uma bactéria estritamente aeróbica atuando como doadora e um tripanossomatídeo ancestral atuando como receptor. O fato de a iPDH não ter sido encontrada nos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia* e *Herpetomonas* (Uttaro et al., 1997) sugere que a aquisição deste gene teria conferido uma vantagem seletiva para um tripanossomatídeo que vive em floema e látex de plantas (Molinas et al., 2003).

Em resumo, o fato de termos encontrado no fitoflagelado *P. serpens* uma sequência que apresenta elevada similaridade com enzimas dependentes de TPP de bactérias associadas a plantas sugere um processo de transmissão horizontal gênica, como proposto para o gene de iPDH comentado acima.

1. 3 Enzimas dependentes de TPP

A coenzima TPP (Figura 3), forma biologicamente ativa da vitamina B₁, é um cofator essencial em diversas reações enzimáticas metabolicamente críticas que envolvem a quebra de pontes C-C (carbono-carbono) adjacentes a um grupo carbonila. A primeira estrutura tridimensional determinada para uma enzima dependente de TPP foi a da transcetolase (Lindqvist *et al.*, 1992). Subsequentemente, foram obtidas as estruturas da piruvato oxidase (Muller e Schulz, 1993), piruvato descarboxilase (Dyda *et al.*, 1993), e de outras enzimas dependentes de TPP (Duggleby, 2006).

Figura 3 - Estrutura química da Tiamina Pirofosfato (TPP).



FONTE: lenne (2012).

Estas enzimas incluem uma vasta classe de α -cetoácido descarboxilases, tanto não-oxidativas (como as PDCs e IPDCs), quanto oxidativas (as piruvato desidrogenases e piruvato oxidases), assim como as transcetolases. O conhecimento da estrutura tridimensional, aliado à análise de sequências, permitiu classificar as enzimas dependentes de TPP em cinco famílias: DC (descarboxilases), TK (transcetolases), OR (oxidoreduases), e K1 e K2 (desidrogenases). Todas estas enzimas possuem uma região conservada, conhecida como assinatura das enzimas dependentes de TPP, que começa com os resíduos -GDG- e termina com -NN- e que corresponde a um sítio de ligação de Mg²⁺ e da porção difosfato da TPP (Hawkins *et al.*, 1989; Koga *et al.*, 1992; Koga, 1995; Schütz *et al.*, 2003a).

Duggleby (2006) verificou que os domínios N- e C-terminal estão presentes nas cinco famílias de enzimas dependentes de TPP, e que o terceiro domínio (Central) está presente somente nas famílias DC (descarboxilases) e TK (transcetolases), embora a ordem dos domínios na sequência proteica não seja

similar nas duas famílias. Para assumir sua atividade, as descarboxilases precisam estar ligadas aos cofatores TPP e Mg^{2+} , uma interação altamente conservada entre as enzimas dependentes de TPP (Schütz *et al.*, 2003b).

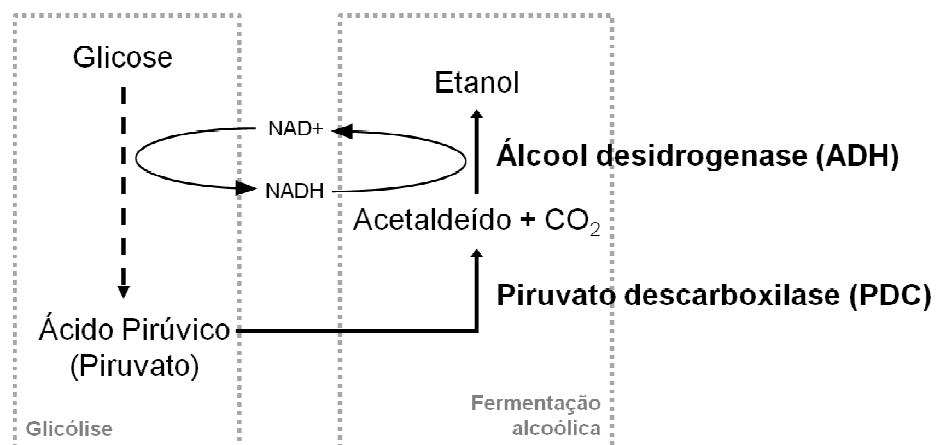
1.4 PDC/IPDC de *P. serpens*

As enzimas PDC (EC 4.1.1.1) e IPDC (EC 4.1.1.74) apresentam elevada similaridade estrutural, que não permite a atribuição funcional inequívoca baseada unicamente em suas sequências nucleotídicas ou proteicas. Diferenças significativas entre as duas enzimas residem na especificidade e afinidade pelos substratos (Schütz *et al.*, 2003a). As PDCs apresentam K_M para ácido pirúvico da ordem de mM (1,3 mM para a PDC de *Saccharomyces cerevisiae*; Boiteux e Hess, 1970); ao passo que a K_M das IPDCs para ácido indol-3-pirúvico é da ordem de μM (15 μM para a IPDC de *E. cloacae*; Koga *et al.*, 1992, 1995).

Nesta altura surgem as perguntas – a enzima codificada pelo gene *PDC/IPDC* de *P. serpens* teria atividade de piruvato descarboxilase ou de indolpiruvato descarboxilase? Que vantagem adaptativa esta atividade conferiria ao fitoflagelado?

A PDC é a enzima chave do processo de fermentação alcoólica, no qual a enzima converte o ácido pirúvico produzido na glicólise em acetaldeído e dióxido de carbono. O acetaldeído é subsequentemente reduzido a etanol por uma álcool desidrogenase (ADH), com a oxidação concomitante de NADH (Figura 4).

Figura 4 - Esquema do processo de fermentação alcoólica e as principais enzimas envolvidas: piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase.



FONTE: lenne (2012).

A aquisição de uma atividade PDC é particularmente interessante para *Phytomonas* uma vez que a fermentação alcoólica representaria um mecanismo para oxidar parte do NADH formado na glicólise (Figura 4), garantindo o funcionamento desta via, principal responsável pela produção de ATP (Bringaud et al., 2006). Conforme especificado acima, em *Phytomonas* a cadeia respiratória não é funcional, assim como o ciclo de Krebs (Sánchez-Moreno et al., 1992; Maslov et al., 1999; Nawathean e Maslov, 2000; González-Halphen e Maslov, 2004). Nossa hipótese de uma atividade PDC explicaria observações anteriores de que em *Phytomonas* etanol é um dos produtos principais do catabolismo da glicose em condições de aerobiose e anaerobiose (Sanchez-Moreno et al. 1992; Chaumont et al., 1994). Digno de nota é o fato de uma atividade de PDC nunca ter sido descrita nestes flagelados.

A enzima IPDC é considerada a enzima-chave na via de biossíntese do ácido indol-3-acético (auxina, AIA) (Koga et al., 1991a; Koga, 1995) (Figura 5), um dos hormônios vegetais mais importantes. A auxina desempenha papel fundamental nos processos de formação de raiz e divisão celular, promovendo o alongamento do caule e inibindo o alongamento da raiz, atuando ainda na dominância apical, abscisão foliar e desenvolvimento de fruto partenocárpico (Purves et al., 2002; Woodward e Bartel, 2005).

Embora seja amplamente aceito que as plantas usam diversas vias para sintetizar AIA, as enzimas, intermediários metabólicos e genes codificadores não estão bem caracterizados (Woodward e Bartel, 2005). Até o momento, não foi descrita uma IPDC em plantas. Supõe-se que, caso esta enzima esteja presente, seja instável e/ou exista em baixas concentrações (Koga et al., 1991b, 1992).

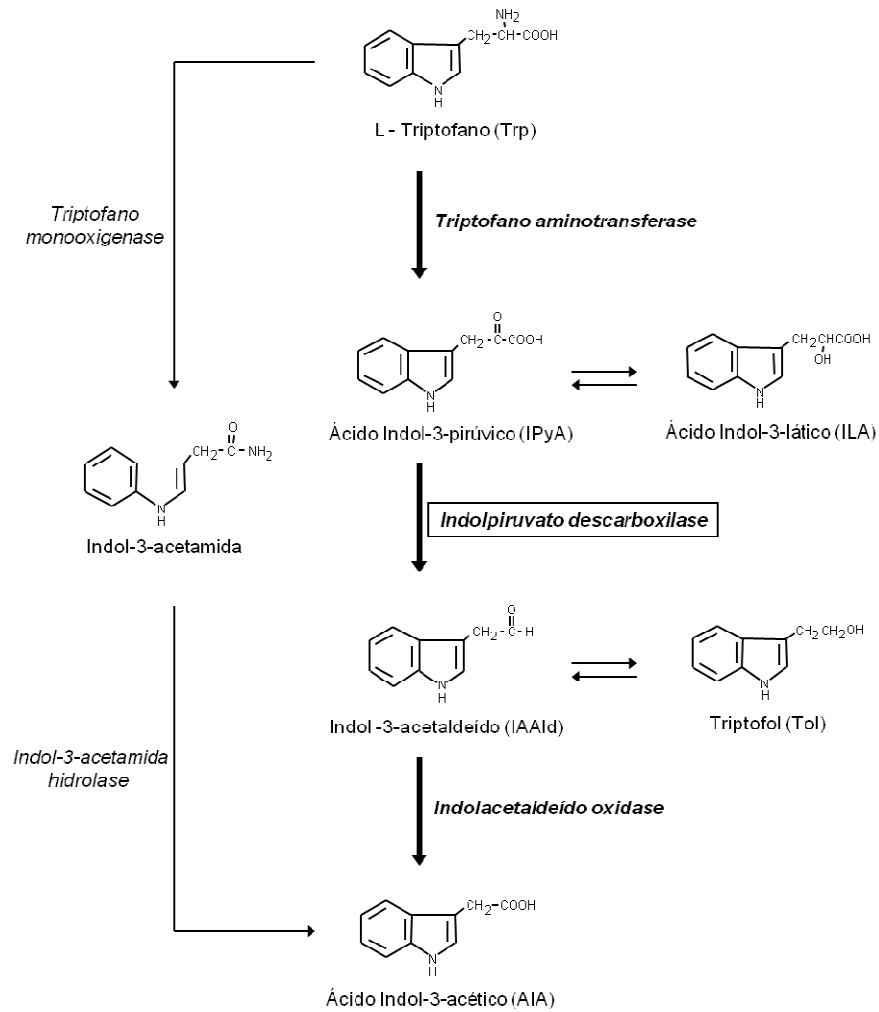
A capacidade de produzir AIA é amplamente difundida em bactérias associadas a plantas (Patten e Glick, 1996; Spaepen e Vanderleyden, 2010). O interesse no estudo da produção de AIA em bactérias não deriva apenas dos efeitos fisiológicos que os fitormônios promovem em plantas, mas também do possível papel nas interações planta-bactéria. Bactérias cujos genes codificam enzimas que levam à síntese de AIA estão envolvidas em patogênese de plantas ou podem ser responsáveis por promover o crescimento destas (Costacurta e Vanderleyden, 1995). Vários destes microorganismos, tais como *Agrobacterium tumefaciens*, *E. herbicola* e patovars de *Pseudomonas syringae* (*savastanoi* e *syringae*) estão relacionados com patogênese em plantas, ao passo que outros microorganismos

como *E. cloacae*, *Azospirillum brasilense*, *P. putida*, *E. herbicola*, *Halomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Acetobacter diazotrophicus* e *Bradyrhizobium japonicum* são reportados como agentes que estimulam o crescimento vegetal contribuindo para o “pool” endógeno de AIA da planta (Costacurta e Vanderleyden, 1995; Brandl et al., 1996; Patten e Glick, 1996; Ona et al., 2005; Spaepen et al., 2007).

A síntese de AIA em bactérias a partir de triptofano pode seguir duas vias principais (Figura 5). Na primeira via (setas em negrito), o triptofano sofre transaminação a ácido indol-3-pirúvico, o qual é descarboxilado a indol-3-acetaldeído pela IPDC. Subsequentemente uma indolacetaldeído oxidase transforma o indol-3-acetaldeído em ácido indol-3-acético. Ácido indol-3-lático e triptofol são formados de forma reversível a partir de ácido indol-3-pirúvico e indol-3-acetaldeído, respectivamente, e podem ser produtos de armazenamento importantes envolvidos na regulação da biossíntese de AIA (Koga et al., 1991a). Na segunda via (setas finas), o triptofano é convertido em indol-3-acetamida, que dá origem ao AIA. A segunda via seria preferencial em cepas consideradas patogênicas (Spaepen e Vanderleyden, 2010) e ocorreria sem a participação da IPDC.

Pelo exposto acima, em tese, a aquisição de uma atividade IPDC também poderia trazer vantagens adaptativas a *P. serpens*, flagelado encontrado em tomates e que não causa patogenia (Jankevicius et al. 1988; Jankevicius et al., 1989, Camargo et al. 1990).

Figura 5 - Vias de síntese de AIA em bactérias a partir do Triptofano.



Em itálico encontram-se os nomes das enzimas que catalisam as reações. A IPDC, tema desta tese, é indicada com um retângulo. As setas em negrito indicam a via preferencial em cepas não patogênicas. ILA e Tol são reversivelmente formados, respectivamente, a partir de IPyA e IAAld, de maneira não enzimática.

FONTE: Adaptado de Koga et al., 1991a.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Caracterizamos a sequência completa do gene que codifica uma PDC/IPDC de *P. serpens* e verificamos que esta sequência é conservada em 14 isolados de *Phytomonas*. Em *P. serpens* este gene está presente em pelo menos seis cópias em tandem, separadas por uma região intergênica de 124 pb de sequência bastante conservada (apenas três variantes na região 3' UTR). O aumento do número de cópias gênicas determinaria um incremento de 5,7 vezes na abundância dos transcritos correspondentes. A amplificação do número de cópias e transcritos sugere que o gene *PDC/IPDC* desempenhe funções importantes no metabolismo do fitoflagelado e, possivelmente, em sua adaptação à planta hospedeira.

Verificamos que a proteína codificada pelo gene *PDC/IPDC* apresenta elevada similaridade com sequências proteicas de *Leishmania* spp., fitobactérias e fungos. Por outro lado, esta sequência não foi encontrada no genoma de *T. cruzi* ou *T. brucei*.

A análise filogenética indica que a proteína de *Phytomonas* é robustamente monofilética com as enzimas de *Leishmania* spp. e *C. fasciculata*. Este clado aparece como grupo-irmão de IPDCs de gama-proteobactérias. Isso apoia a proposição que um evento de transferência horizontal gênica a partir de uma fitobactéria doadora para um tripanossomatídeo ancestral tenha ocorrido antes da separação entre *Phytomonas*, *Leishmania* e *Crithidia*.

A partir de ensaios de PCR e *Southern blotting*, inferimos a presença de genes *PDC/IPDC* ortólogos putativos em alguns representantes dos gêneros *Herpetomonas*, *Crithidia* e *Leishmania*.

Investigamos a funcionalidade da PDC/IPDC. Detectamos a presença de etanol nos meios condicionados de *P. serpens*, cuja concentração aumenta com a adição de glicose ao meio. Isto apoia observações de outros grupos e a hipótese que a enzima seja uma piruvato descarboxilase (PDC) atuante na fermentação alcoólica.

Também detectamos AIA e seus precursores no meio condicionado de *P. serpens*, embora em níveis bem inferiores quando comparado com os de etanol. O acúmulo de AIA e seu intermediário Tol mostrou uma correlação direta com a adição de triptofano ao meio. Lembrando que triptofano é precursor da biossíntese do fitormônio AIA, os dados sugerem que a enzima de *P. serpens* também tenha atividade de IPDC.

A funcionalidade do AIA produzido por *P. serpens* foi investigada em bioensaios de alongamento de hipocótilos de tomate. Verificamos que o meio condicionado promoveu um alongamento de 15% dos hipocótilos e promoveu sua curvatura, efeito análogo ao observado quando AIA exógeno foi adicionado aos hipocótilos.

Para verificar se AIA seria produzido *in vivo*, tomates Micro-Tom foram inoculados com *P. serpens* e mantidos nas plantas. Como controle, alternativamente, os frutos foram inoculados com PBS, *T. cruzi*, ou AIA exógeno. A quantificação do fitormônio no pericarpo dos tomates ao longo do período de infecção (7 ou 14 dias) indica não haver variação significativa na quantidade de AIA livre tanto nos frutos inoculados com *P. serpens* quanto nos demais controles. Por outro lado, as quantidades de AIA-amida e AIA-éster aumentaram significativamente apenas nos frutos inoculados com *P. serpens* e AIA exógeno. Desta forma, os dados sugerem que o tripanossomatídeo esteja contribuindo com o *pool* do fitormônio nos frutos, e que o excesso de auxina seja convertido na forma de éster ou amida, para seu armazenamento ou degradação. Tendo em vista que em frutos de tomate os níveis de AIA começam a cair ao longo do processo de maturação, na infecção por *P. serpens* a conversão do AIA produzido por este organismo nas formas conjugadas seria uma resposta do hospedeiro no controle dos níveis de AIA livre, atuando, portanto, na homeostasia da relação parasita-hospedeiro.

Tomados em seu conjunto os dados indicam que a enzima de *P. serpens* tenha atividade PDC e IPDC.

Caracterizamos a atividade PDC em extratos de *P. serpens* e na enzima PDC/IPDC recombinante. Nos extratos a atividade enzimática exibe uma cinética clássica michaeliana com K_M para piruvato de 1,4 mM. Na enzima recombinante o K_M obtido foi de 2,4 mM. A afinidade pelo substrato é similar à afinidade para piruvato da PDC de *S. cerevisiae* e IPDC de *E. cloacae*. Indolpiruvato age como inibidor competitivo da atividade PDC, elevando o valor da K_M para 4,0 e 9,3 (extratos de *P. serpens*) quando da adição deste composto nas concentrações de 1 ou 2 mM, respectivamente, sem alteração da V_{max} . Para a enzima recombinante, também foi confirmada a atuação de indolpiruvato como inibidor competitivo da reação, elevando a K_M para 3,6 mM quando da adição deste composto na concentração de 1 mM.

Dados preliminares indicam haver atividade IPDC no extrato de *P. serpens*, com a formação dos produtos IAAId e AIA nos meios reacionais. A análise

comparativa das atividades PDC e IPDC nos extratos de *P. serpens* sugere que a atividade PDC seja cerca de 30.000 vezes maior que a atividade IPDC. Talvez isto explique por que não foi possível determinar, até o momento, atividade IPDC na enzima recombinante. Por outro lado, conseguimos detectar IAAld, produto da reação da IPDC, no meio de cultura da bactéria recombinante que expressa o gene *PDC/IPDC*. O acúmulo deste produto aumenta com a adição de triptofano ao meio de cultura.

Desta forma, concluímos que a PDC/IPDC seria uma 2-cetoácido descaboxilase, com atividade catalítica variável para diferentes substratos, como por exemplo piruvato e indolpiruvato. A atividade PDC parece ser predominante em *P. serpens*, permitindo sua sobrevivência no meio rico em carboidratos do hospedeiro vegetal. A aquisição de uma PDC, enzima chave no processo de fermentação alcoólica, conferiria ao flagelado uma rota alternativa e necessária para re-oxidação de parte do NADH produzido na via glicolítica.

A enzima PDC/IPDC poderia ainda atuar sobre o ácido indolpirúvico, produzido a partir do triptofano, gerando AIA como sub-produto. Nossos dados sugerem, no entanto, que a produção de AIA não esteja contribuindo para a adaptação do flagelado ao hospedeiro vegetal, uma vez que nos tomates infectados o AIA excedente é convertido nas formas AIA-éster e AIA-amida.

Tendo em vista que o gene *PDC/IPDC* apresenta estrutura conservada em diferentes isolados de *Phytomonas* será de interesse verificar a funcionalidade da enzima correspondente em flagelados que causam enfermidades devastadoras em plantações de interesse econômico.

“It is clear that not only plants and bacteria will take part in the IAA conversations [...], researchers in plant science and microbiology will undoubtedly continue talking about this intriguing molecule.”
(Spaepen, Vanderleyden e Remans, 2007).

REFERÊNCIAS²

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk J Biol.* 2005;29:29-34.

Alves JM, Voegtly L, Matveyev AV, Lara AM, da Silva FM, Serrano MG, Buck GA, Teixeira MM, Camargo EP. Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts. *PLoS One* 2011;6:e23518.

Bashan Y, de-Bashan LE. Chapter Two: How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth - A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*, 2010;108:77–136.

Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C, Eddy SR. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D138-41. Database Issue.

Batistoti M, Cavazzana M Jr, Serrano MG, Ogatta SF, Baccan GC, Jankevicius JV, Teixeira MM, Jankevicius SI. Genetic variability of trypanosomatids isolated from phytophagous hemiptera defined by morphological, biochemical, and molecular taxonomic markers. *J Parasitol.* 2001;87(6):1335-41.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 2005;309(5733):416-22.

Boiteux A, Hess B. Allosteric properties of yeast pyruvate decarboxylase. *FEBS Lett.* 1970;9(5):293-6.

² **De acordo com:** International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html [2007 May 22].

Boto L. Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proc Biol Sci.* 2010;277(1683):819-27.

Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK, Davies C. Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *J Exp Bot.* 2010;61(13):3615-25.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Brandl MT, Lindow SE. Environmental signals modulate the expression of an Indole-3-Acetic Acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 1997;10:499-505.

Brandl MT, Lindow SE. Contribution of Indole-3-Acetic Acid production to the epiphytic fitness of *Erwinia herbicola*. *Appl. Environ. Microb.* 1998;64:3256-3263.

Brandl M, Clark EM, Lindow SE. Characterization of the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. *Can. J. Microbiol.* 1996;42:586-92.

Brandl M, Quiñones B, Lindow SE. Heterogeneous transcription of an indoleacetic acid biosynthetic gene in *Erwinia herbicola* on plant surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98:3454-9.

Breganó JW, Picão RC, Graça VK, Menolli RA, Itow Jankevicius S, Pinge Filho P, Jankevicius JV. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;39(3):257-64.

Bringaud F, Rivière L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;149(1):1-9.

Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;104(2):219-32.

Buta JG, Spaulding DW. Changes in indole-3-acetic acid and abscisic acid levels during tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit development and ripening. *J Plant Growth Regul.*, 1994;13:163-6.

Camargo EP, Silva S, Roitman I, de Souza W, Jankevicius JV, Dollet M. Enzymes of ornithine-arginine metabolism in trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J Eukaryot Microbiol.*, 1987;34:439-41.

Camargo EP, Coelho JA, Moraes G, Figueiredo EN. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp Parasitol.* 1978;46(2):141-4.

Camargo EP. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Adv Parasitol.* 1999;42:29-112.

Camargo EP, Kastelein P, Roitman I. Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). *Parasitol Today.* 1990;6(1):22-5.

Canepa GE, Carrillo C, Armesto AR, Bouvier LA, Miranda MR, Pereira CA. *Phytomonas*: transport of amino acids, hexoses and polyamines. *Exp Parasitol.* 2007;117(1):106-10.

Castellani O, Ribeiro LV, Fernandes JF. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. *J Protozool.* 1967;14(3):447-51.

Catalá C, Ostin A, Chamarro J, Sandberg G, Crozier A. Metabolism of indole-3-acetic acid by pericarp discs from immature and mature tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Plant Physiol.* 1992;100(3):1457-63.

Catarino LM, Serrano MG, Cavazzana M Jr, Almeida ML, Kaneshina EK, Campaner M, Jankevicius JV, Teixeira MM, Itow-Jankevicius S. Classification of trypanosomatids from fruits and seeds using morphological, biochemical and molecular markers revealed several genera among fruit isolates. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;201(1):65-72.

Chaumont F, Schanck AN, Blum JJ, Opperdoes FR. Aerobic and anaerobic glucose metabolism of *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;67(2):321-31.

Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;156(2):93-101.

Cohen JD, Bandurski RS. Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu Rev Plant Physiol.* 1982;33:403-30.

Conchon I, Campaner M, Sbravat C, Camargo E P. Trypanosomatids, other than *Phytomonas* spp., isolated and cultured from fruit. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1989;36:412-4.

Corradi N, Croll D, Colard A, Kuhn G, Ehinger M, Sanders IR. Gene copy number polymorphisms in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(1):366-9.

Corradi N, Ruffner B, Croll D, Colard A, Horák A, Sanders IR. High-level molecular diversity of copper-zinc superoxide dismutase genes among and within species of arbuscular Mycorrhizal fungi. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(7):1970-8.

Costacurta A, Vanderleyden J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 1995;21(1):1-18.

Costacurta A, Keijers V, Vanderleyden J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol Gen Genet.* 1994;243(4):463-72.

Costelloe SJ, Ward JM, Dalby PA. Evolutionary analysis of the TPP-dependent enzyme family. *J Mol Evol.* 2008;66(1):36-49.

Darling TN, Davis DG, London RE, Blum JJ. Products of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glycerol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(20):7129-33.

Dollet M. Plant diseases caused by flagellate Protozoa. *Ann. Rev. Phytopathol.* 1984;22:115-32.

Dollet M, Sturm NR, Sánchez-Moreno M, Campbell DA. 5S ribosomal RNA gene repeat sequences define at least eight groups of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): phloem-restricted pathogens form a distinct section. *J Eukaryot Microbiol.* 2000;47(6):569-74.

Dollet M, Sturm NR, Campbell DA. The spliced leader RNA gene array in phloem-restricted plant trypanosomatids (*Phytomonas*) partitions into two major groupings: epidemiological implications. *Parasitology.* 2001a;122(Pt 3):289-97.

Dollet M, Sturm NR, Ahomadegbe JC, Campbell DA. Kinetoplast DNA minicircles of phloem-restricted *Phytomonas* associated with wilt diseases of coconut and oil palms have a two-domain structure. *FEMS Microbiol Lett.* 2001b;205(1):65-9.

Dollet M, Sturm NR, Campbell DA. The internal transcribed spacer of ribosomal RNA genes in plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) resolves 10 groups. *Infect Genet Evol.* 2011. In press. [doi: 10.1016/j.meegid.2011.11.010]

Duggleby RG. Domain relationships in thiamine diphosphate-dependent enzymes. *Acc Chem Res.* 2006;39(8):550-7.

Dyda F, Furey W, Swaminathan S, Sax M, Farrenkopf B, Jordan F. Catalytic centers in the thiamin diphosphate dependent enzyme pyruvate decarboxylase at 2.4-Å resolution. *Biochemistry.* 1993;32(24):6165-70.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.* 2005;309(5733):404-9.

Gibson RA, Schneider EA, Wightman F. Biosynthesis and Metabolism of Indol-3yl-acetic acid: II. In vivo experiments with ¹⁴C-labelled precursors of IAA in tomato and barley shoots. *J Exp Bot.* 1972;23:381-99.

González-Halphen D, Maslov DA. NADH-ubiquinone oxidoreductase activity in the kinetoplasts of the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Parasitol Res. 2004;92(4):341-6.

Graça-de Souza VK, Monteiro-Góes V, Manque P, Souza TA, Corrêa PR, Buck GA, Ávila AR, Yamauchi LM, Pinge-Filho P, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Sera of chagasic patients react with antigens from the tomato parasite *Phytomonas serpens*. Biol Res. 2010;43(2):233-41.

Grace TD. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. Nature. 1962;195:788-9.

Guerrini F, Segur C, Gargani D, Tibayrenc M, Dollet M. An Isoenzyme Analysis of the Genus *Phytomonas*: Genetic, Taxonomic and Epidemiologic Significance. J Eukaryot Microbiol. 1992;39(4):516-21.

Hall, TA, BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 1999;41:95-8.

Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Mol Phylogenet Evol. 2007;44(1):15-25.

Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora JP, Rigden DJ, Michels PA, Opperdoes FR. Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(3):1067-71.

Hawkins CF, Borges A, Perham RN. A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. FEBS Lett. 1989;255(1):77-82.

Hohmann S. Characterization of PDC6, a third structural gene for pyruvate decarboxylase in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1991;173:7963-9.

Hollar L, Maslov DA. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. Mol Biochem Parasitol. 1997;89(2):295-9.

Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: Evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. Mol Biol Evol. 2003;20:644-652.

Huysamer M, Greve LC, Labavitch JM. Cell wall metabolism in ripening fruit. VIII. Cell wall composition and synthetic capacity of two regions of the outer pericarp of mature green and red ripe cv. Jackpot tomatoes. Physiol Plantarum 1997;101(2):314-22.

Ienne, S. *Phytomonas serpens*: Caracterização da piruvato/indolpiruvato descarboxilase e funcionalidade da auxina produzida. [Tese (Doutorado em Parasitologia)] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012.

lenne S, Pappas G Jr, Benabdellah K, González A, Zingales B. Horizontal gene transfer confers fermentative metabolism in the respiratory-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Infect Genet Evol. 2012. In press. [doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.016]

Jankevicius JV, Itow-Jankevicius S, Maeda LA, Campaner M, Conchon I, do Carmo JB, Dutra-Menezes MC, Menezes JR, Camargo EP, Roitman I, Traub-Csekö YM; Borges MB; Moreira N. Ciclo biológico de *Phytomonas* [Biological cycle of *Phytomonas*]. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988;83(Suppl 1):601-10.

Jankevicius JV, Jankevicius SI, Campaner M, Conchon I, Maeda LA, Teixeira MMG, Freymuller E, Camargo EP. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (Gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. J. Protozool. 1989;36:265-271.

Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. Mol Cell Biol. 1990;10(3):1084-94.

Karnwal, A. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates. J Plant Pathol. 2009;91(1):61-3.

Kelly MO, Bradford KJ. Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. Plant Physiol. 1986;82(3):713-7.

Kitajima EW, Vainstein MH, Silveira JSM. Flagellate Protozoon associated with poor development of the root system of cassava in the Espírito Santo State, Brazil. Phytopathology 1986;76:638-642.

Koga J. Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. Biochim Biophys Acta. 1995;18:1249(1):1-13.

Koga J, Adachi T, Hidaka H. IAA Biosynthetic Pathway from Tryptophan via Indole-3-pyruvic Acid in *Enterobacter cloacae*. Agric. Biol. Chem., v. 55, p. 701-706, 1991a.

Koga J, Adachi T, Hidaka H. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*. Mol Gen Genet. 1991b;226(1-2):10-6.

Koga J, Adachi T, Hidaka H. Purification and characterization of indolepyruvate decarboxylase. A novel enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Enterobacter cloacae*. J Biol Chem. 1992;267(22):15823-8.

Korený L, Lukes J, Oborník M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? Int J Parasitol. 2010;40(2):149-56.

Lambrecht M, Okon Y, Vande Broek A, Vanderleyden J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. Trends Microbiol. 2000;8(7):298-300.

Lawrence JG, Ochman H. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol.* 1997;44:383-397.

Lawrence JG, Ochman H. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:9413-7.

Lindqvist Y, Schneider G, Ermler U, Sundström M. Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 1992;11(7):2373-9.

Marché S, Roth C, Philippe H, Dollet M, Baltz T. Characterization and detection of plant trypanosomatids by sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Mol Biochem Parasitol.* 1995;71(1):15-26.

Marcora MS, Cejas S, González NS, Carrillo C, Algranati ID. Polyamine biosynthesis in *Phytomonas*: biochemical characterisation of a very unstable ornithine decarboxylase. *Int J Parasitol.* 2010;40(12):1389-94.

Marín C, Hitos AB, Rodríguez-González I, Dollet M, Sánchez-Moreno M. *Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;234(1):69-74.

Marín C, Rodríguez-González I, Sánchez-Moreno M. Identification of excreted iron superoxide dismutase for the diagnosis of *Phytomonas*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(6):649-54.

Marín C, Alberge B, Dollet M, Pagès M, Bastien P. First complete chromosomal organization of a protozoan plant parasite (*Phytomonas* spp.). *Genomics.* 2008;91(1):88-93.

Marín C, Dollet M, Pagès M, Bastien P. Large differences in the genome organization of different plant Trypanosomatid parasites (*Phytomonas* spp.) reveal wide evolutionary divergences between taxa. *Infect Genet Evol.* 2009;9(2):235-40.

Maslov DA, Nawathean P, Scheel J. Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;99(2):207-21.

Maslov DA, Podlipaev SA, Lukes J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(3):397-402.

Maslov DA, Yurchenko VY, Jirků M, Lukes J. Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. *J Eukaryot Microbiol.* 2010;57(2):177-88.

McGhee RB, Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. *Microbiol Rev.* 1980;44(1):140-73.

Miranda K, Rodrigues CO, Hentchel J, Vercesi A, Plattner H, de Souza W, Docampo R. Acidocalcisomes of *Phytomonas françai* possess distinct morphological characteristics and contain iron. *Microsc Microanal*. 2004;10(5):647-55.

Molinas SM, Altabe SG, Oppendoes FR, Rider MH, Michels PA, Uttaro AD. The multifunctional isopropyl alcohol dehydrogenase of *Phytomonas* sp. could be the result of a horizontal gene transfer from a bacterium to the trypanosomatid lineage. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36169-75.

Møller K, Langkjaer RB, Nielsen J, Piskur J, Olsson L. Pyruvate decarboxylases from the petite-negative yeast *Saccharomyces kluyveri*. *Mol Genet Genomics*. 2004;270(6):558-68.

Monier A, Claverie JM, Ogata H. Horizontal gene transfer and nucleotide compositional anomaly in large DNA viruses. *BMC Genomics*. 2007;8:456.

Moore TC, Shaner CA. Synthesis of indoleacetic acid from tryptophan via indolepyruvic acid in cell-free extracts of pea seedlings. *Arch Biochem Biophys*. 1968;127(1):61321.

Muller YA, Schulz GE. Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. *Science* 1993;259(5097):965-7.

Muller E, Gargani D, Schaeffer V, Stevens J, Fernandez-Becerra C, Sanchez-Moreno M, Dollet M. Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) associated with wilts of cultivated crops: isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. *Eur J Plant Pathol*. 1994;100:425-434.

Muller E, Ahomadegbe JC, Coulaud D, Gargani D, Fernandez-Becerra C, Dollet M. Variability of kinetoplast DNA from plant trypanosomatids responsible for hartrot and marchitez diseases. *Phytopathology* 1995;85:942-947.

Muller E, Gargani D, Banuls AL, Tibayrenc M, Dollet M. Classification of plant trypanosomatids (*Phytomonas* spp.): parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Parasitology* 1997;115(Pt 4):403-9.

Nawathean P, Maslov DA. The absence of genes for cytochrome c oxidase and reductase subunits in maxicircle kinetoplast DNA of the respiration-deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Curr Genet*. 2000;38(2):95-103.

Normanly J. Auxin metabolism. *Physiol Plant*. 1997;100:431-42.

Normanly J, Bartel B. Redundancy as a way of life - IAA metabolism. *Curr Opin Plant Biol*. 1999;2(3):207-13.

Ona O, Van Impe J, Prinsen E, Vanderleyden J. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;246(1):125-32.

Opperdoes FR, Michels PA. Horizontal gene transfer in trypanosomatids. Trends Parasitol. 2007;23(10):470-6.

Ozaki LS, Cseko YMT. Genomic DNA cloning and related techniques. In: Morel CM (Ed.). Genes and Antigens of Parasites: A Laboratory Manual. 2nd ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. Cap. 3.4, p. 165-185.

Pappas GJ Jr, Benabdellah K, Zingales B, González A. Expressed sequence tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. Mol Biochem Parasitol. 2005;142(2):149-57.

Patil, N.B., Gajbhiye, M., Ahiwale, S.S., Gunjal, A.B., Kapadnis, B.P. Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from Sugarcane. Int J Environ Sci. 2011;2(1).

Patten CL, Glick BR. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol. 1996;42(3):207-20. Review.

Patten CL, Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl Environ Microbiol. 2002;68(8):3795-801.

Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiologia: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 333 p.

Petry K, Gargani D, Baltz Th, Kastelein P, Dollet M. Use of Monoclonal Antibodies for Differentiation of Different Isolates of *Phytomonas* (Plant Trypanosomatids). Journal of Phytopathology 1989;126(Issue 1)59-68.

Pinge-Filho P, Peron JP, de Moura TR, Menolli RA, Graça VK, Estevão D, Tadokoro CE, Jankevicius JV, Rizzo LV. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. Immunol Lett. 2005;96(2):283-90.

Purgatto E, Nascimento JRO, Lajolo FM, Cordenunsi BR. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. J Plant Physiol. 2002;159:1105-11.

Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC. Vida: a ciência da biologia. Tradução de Anapaula Somer Vinagre et al. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 1126 p.

Quesada JM, Entrala E, Fernández-Ramos C, Marín C, Sánchez-Moreno M. *Phytomonas* spp: superoxide dismutase in plant trypanosomes. Mol Biochem Parasitol. 2001;115(1):123-7.

Rainey PM, MacKenzie NE. A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1991;45:307-15.

Ryder EF, Robakiewicz P. Statistics for the molecular biologist: group comparisons. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology. New York: Wiley, 1998. pp. A.31.1-A.31.22.

Ryu RJ, Patten CL. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J Bacteriol.* 2008;190(21):7200-8.

Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

Sanchez-Moreno M, Lasztity D, Coppens I, Opperdoes FR. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;54(2):185-99.

Sanchez-Moreno M, Fernandez-Becerra C, Mascaro C, Rosales MJ, Dollet M, Osuna A. Isolation, in vitro culture, ultrastructure study, and characterization by lectin-agglutination tests of *Phytomonas* isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) and cherimoyas (*Annona cherimolia*) in southeastern Spain. *Parasitol Res.* 1995;81(7):575-81.

Santos AL, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An Acad Bras Cienc.* 2006;78(4):687-714.

Sbravate C, Campaner M, Camargo LEA, Conchon I, Teixeira MMG, Camargo EP. Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous Hemiptera in Brazil. *J Eukaryot Microbiol.* 1989;36(Issue 6):543-547.

Schütz A, Golbik R, Tittmann K, Svergun DI, Koch MH, Hübner G, König S. Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. *Eur J Biochem.* 2003a;270(10):2322-31.

Schütz A, Sandalova T, Ricagno S, Hübner G, König S, Schneider G. Crystal structure of thiamindiphosphate-dependent indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Eur J Biochem.* 2003b;270(10):2312-21.

Schütz A, Golbik R, König S, Hübner G, Tittmann K. Intermediates and transition states in thiamin diphosphate-dependent decarboxylases. A kinetic and NMR study on wild-type indolepyruvate decarboxylase and variants using indolepyruvate, benzoylformate, and pyruvate as substrates. *Biochemistry.* 2005;44(16):6164-79.

Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Trypanosomatidae: *Phytomonas* detection in plants and phytophagous insects by PCR amplification of a genus-specific sequence of the spliced leader gene. *Exp Parasitol.* 1999;91(3):268-79.

Sgrillo RB, Moura JIL, Sgrillo KRPA. Simulation model for phytomona epidemics in coconut trees. *Neotrop. Entomol.* 2005;34(4). [doi: 10.1590/S1519-566X2005000400001]

Singha UK, Bhakuni V, Ali V, Roy R. *Leishmania donovani*: metabolite mapping of promastigotes using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Mol Cell Biochem.* 1996;162(1):17-22.

Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31(4):425-48.

Spaepen S, Vanderleyden J. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010. [doi: 10.1101/cshperspect.a001438]

Spaepen S, Versées W, Gocke D, Pohl M, Steyaert J, Vanderleyden J. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. *J Bacteriol.* 2007;189(21):7626-33.

Sturm NR, Dollet M, Lukes J, Campbell DA. Rational sub-division of plant trypanosomes (*Phytomonas* spp.) based on minicircle conserved region analysis. *Infect Genet Evol.* 2007;7(5):570-6.

Teixeira MMG, Camargo EP. Monoclonal antibodies for the identification of trypanosomatids of the genus *Phytomonas*. *J. Protozool.* 1989;36:262-264.

Teixeira MM, Serrano MG, Nunes LR, Campaner M, Buck GA, Camargo EP. Trypanosomatidae: a spliced-leader-derived probe specific for the genus *Phytomonas*. *Exp Parasitol.* 1996;84(3):311-9.

Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol.* 1997;66(3):197-238.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(22):4673-80.

Tielens AG, Van Hellemond JJ. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. *Parasitol Today.* 1998;14(7):265-72.

Uttaro AD, Sanchez-Moreno M, Opperdoes FR. Genus-specific biochemical markers for *Phytomonas* spp. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;90(1):337-42.

Vainstein MH, Roitman I. Cultivation of *Phytomonas françai* associated with poor development of root system of cassava. *J. Protozool.* 1986;33:511-513.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol.* 1994;24(8):1317-31.

Vilas Boas EVB, Chitarra AB, Maluf WR, Chitarra MIF. Modificações texturais de tomates heterozigotos no loco alcobaça. *Pesq Agropec Bras.* 2000;35(7):1447-53.

Waller RF, McConville MJ, McFadden GI. More plastids in human parasites? *Trends Parasitol.* 2004;20(2):54-7.

Warwick DRN. Principais características do anel-vermelho e murcha-de-fitomonas. Embrapa Tabuleiros Costeiros 2005;comunicado Técnico 38, Aracaju, SE.

Weiss PM, Garcia GA, Kenyon GL, Cleland WW, Cook PF. Kinetics and mechanism of benzoylformate decarboxylase using ^{13}C and solvent deuterium isotope effects on benzoylformate and benzoylformate analogues. *Biochemistry.* 1988;27(6):2197-205.

Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot.* 2005;95(5):707-35.