INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Dissertação de Mestrado

Leandro Marcio Moreira

**Análise comparativa entre os genomas dos fitopatógenos
Xylella fastidiosa e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri***

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Rasera da Silva

São Paulo, 04 de Novembro de 2002

INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

20.246
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Dissertação de Mestrado

Leandro Marcio Moreira

Análise comparativa entre os genomas dos fitopatógenos
Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri

Orientadora: Dra. Ana Cláudia Rasera da Silva

São Paulo, 04 de Novembro de 2002

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005056

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Moreira, Leandro Marcio
M838L Análise comparativa entre os genomas dos fitopatógenos
Xylella fastidiosa e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* /
Leandro Marcio Moreira. -- São Paulo, 2002.
1v.(paginação irregular).

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Silva, Ana Cláudia Rasera da

1. Genoma : Biologia molecular 2. Biologia molecular
3. Bioquímica I. T. II. Silva, Ana Cláudia Rasera da,
orientador.

574.88CDD

**“Análise Comparativa Entre os
Genomas dos Fitopatógenos *Xylella
fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv.
citri”**

LEANDRO MARCIO MOREIRA

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. ANA CLÁUDIA RASERA DA SILVA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. GLÁUCIA MENDES SOUZA
IQ - USP

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK
ICB – USP

SÃO PAULO
04 DE NOVEMBRO 2002.

Este trabalho é dedicado à pessoa que educou-me, que deu-me uma visão social crítica e que mostrou-me que as atividades a serem realizadas em nossas vidas, devem ser feitas com todo amor, carinho e dedicação, minha mãe

**Maria Petronilha Cortes Moreira
(1947 – 2000)**

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dra. **Ana Cláudia Rasera da Silva** pela oportunidade cedida, pelo apoio dado durante os vários graus de desenvolvimento intelectual obtidos no decorrer dos meus trabalhos no Instituto de Química da USP, e por ser a excepcional pesquisadora científica que é.

Agradeço a minha noiva **Edmara Rocha dos Santos**, pelo apoio dado durante as conquistas e derrotas dentro e fora da Universidade e por ser a pessoa que me faz acreditar que o mundo pode ser melhor, e que esta melhora só depende de nós mesmos. Esta conquista também é sua, **EU TE AMO**.

A meu pai **José Osmar Moreira**, por ter acreditado que um dia eu pudesse vencer na vida, e por ter-me dado toda a educação que tenho hoje.

A minha mãe, **Maria P. C. Moreira**, que infelizmente não pôde acompanhar o término de mais este estágio da minha formação, mas que deve estar olhando por todos nós lá de cima.

A minha família de uma forma geral, que sempre me apoiou nos estudos.

Agradeço também todos os educadores que participaram de minha formação, com carinho especial ao Prof. **Horácio Bernardo**, responsável por me mostrar que a biologia é ainda mais linda na prática.

Aos meus eternos amigos e companheiros de laboratório: **Jean Marcel, Stefano Pashalidis, Julio César Levano, Adriana Matsukumu, Denise Yamamoto, Paulo Zaini, Tie Koide, Renato Alvarenga, Fernando Ariel Genta (miguelito), Deodoro Oliveira, Fernando Fortes Valença (DF), Sandro Marques e Marcelo Batista**.

A todos os técnicos e funcionários, em especial aos do bloco 0 superior, pelo carinho, paciência e apoio demonstrados.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pela concessão da bolsa e apoio técnico, e a Universidade de São Paulo pela oportunidade concedida.

E finalmente, como não poderia deixar de ser, à força Divina que nos fornece a essência do viver.

Sumário

Abreviaturas	3
Resumo	4
Abstract	5
1 - Introdução	6
1.1 - <i>Xanthomonas citri</i> e o Cancro Cítrico	6
1.2 - <i>Xylella fastidiosa</i> e o CVC	9
1.3 - Seqüenciamento e anotação do genoma de <i>Xanthomonas citri</i>	11
1.4 – Genes de virulência e patogenicidade	12
2 - Objetivos	14
3 - Metodologias	15
3.1 – Seqüenciamento e obtenção das regiões codificantes (CDS's)	15
3.2 – Anotação, categorização e análise das vias metabólicas	17
3.3 - Análise da organização estrutural dos genes nos genomas dos fitopatógenos <i>Xanthomonas citri</i> e <i>Xylella fastidiosa</i>	20
3.4 – Análise filogenética	22
4- Resultados	23
4.1 - Anotação	23
4.2 – Características gerais do metabolismo de <i>Xanthomonas citri</i>	24
4.2.1 – Degradação de macro e pequenas moléculas	24
4.2.2 – Metabolismo central	25
4.2.3 – Metabolismo energético	25
4.2.4 – Genes de funções regulatórias	27
4.3 – Análise da organização estrutural dos genes nos genomas dos fitopatógenos <i>Xanthomonas citri</i> e <i>Xylella fastidiosa</i>	28
4.3.1 – Análise dos <i>runs</i> exclusivos de Xf e Xac	30
4.4 – Análise comparativa entre <i>Xylella fastidiosa</i> e <i>Xanthomonas citri</i>	37
4.4.1 - Metabolismo energético	39
4.4.2 - Metabolismo de aminoácidos	43
4.4.2.1 – Organização dos <i>operons</i> relacionados com metabolismo de aminoácidos	44

4.4.3 – Metabolismo de enxofre	47
4.4.4 – Aminoacil tRNA's	47
4.4.5 - Metabolismo de Ferro	48
4.4.5.1 - Biossíntese de colicinas	50
4.4.5.2 - Receptores de membrana para ferro e colicinas	52
4.4.5.3 - Transportadores de membrana	53
4.4.6 - Sistema Secretório do tipo II	60
4.4.7 - <i>Operon</i> de goma e genes <i>rpf</i>	63
4.4.8 - Quimiotaxia e Biossíntese Flagelar	68
4.4.9 - Pili / Fímbrias	76
4.4.10 - Detoxificação	81
4.4.11 - Sistema de Restrição	82
4.4.12 -Fagos e Elementos Transponíveis	84
5 – Sumário dos Resultados	86
6 - Discussão	87
7 - Referências Bibliográficas	92
8 – Anexos	100
Anexo 1 – Interface de anotação das CDS's de <i>Xanthomonas</i>	100
Anexo 2 - Glicólise e Gliconeogênese	101
Anexo 3 - Ciclo de Krebs – TCA	103
Anexo 4 - Via do Glioxilato	105
Anexo 5 - Pentoses Fosfato	106
Anexo 6 - Biossíntese de Ácidos Graxos	108
Anexo 7 - Degradação de Ácidos Graxos	110
Anexo 8 - Metabolismo de Enxofre	112
Anexo 9 - Fosforilação Oxidativa	114
Anexo 10 - Complexo ATP sintase	118
Anexo 11 - Complexo Piruvato Desidrogenase	119
Anexo 12 – Microscopia Eletrônica de <i>Xanthomonas citri</i>	120
Anexo 13 - Categorias Oficiais de Genes do genoma de <i>Xanthomonas citri</i>	121
Anexo 14 – Resumo Geral	123
Anexo 15 – Artigo Publicado: Nature 417: 459 – 463.	124

Abreviações

- ABC – *ATP Binding Cassete* – Cassete de ligação de ATP;
- ATP – *Adenosine triphosphate* - Trifosfato de adenosina;
- BBH - *Bidirectional Best Hit* – comparação de seqüências com melhores similaridades;
- Blast – *Basic Local Alignment Search Tool* – Ferramenta de busca e de alinhamento básico local;
- c1 – *cluster 1*;
- c2 – *cluster 2*;
- CDS's - *Coding Sequences* – seqüências codificadoras;
- COG – *Clusters of Orthologous Groups* – Grupos de clusteres ortólogos de proteínas;
- E.C. – *Enzyme Code* – Código internacional de determinação da enzima;
- EcoCyc – *Encyclopedia of Escherichia coli Genes and Metabolism* - Enciclopédia de genes e do metabolismo de *Escherichia coli*
- GMP – *Guanosine monophosphate* – Monofosfato de guanosina
- Kegg – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* – Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto;
- MFS – *Major Facilitator Superfamily* – Superfamília de facilitadores principais;
- NAD – *Nicotinamide-adenine dinucleotide* - Nicotinamida adenina dinucleotídeo;
- NCBI – *National Center for Biotechnology Information* – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas;
- ORF's - *Open ReadinG Frames* – fases de leituras abertas;
- Pfam – *Protein family* – Banco de domínios e famílias de proteínas;
- Psort – *Prediction of proteins sorting signals and localization sites in amino acids sequences* – Banco de predição de localização celular das proteínas à partir das seqüências de aminoácidos;
- REDOX – *Reduction and Oxydation* – Redução e Oxidação;
- Run – conjunto de pelo menos 4 genes em mesma organização em dois genomas com pelo menos 3 BBH's;
- ssII – *Secretory System type II* - Sistema secretório tipo II;
- Swiss-Prot (SP- número) – *Protein knowledgebase* – Banco curado de seqüências de proteínas;
- TCA – *Tricarboxylic Cycle Acids* – Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs);
- tRNA – *Transporter RNA* - RNA transportador;
- WT – *Wild Type* – tipo selvagem;
- Xac – *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* – *Xanthomonas*;
- Xcc – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – *Xanthomonas campestris*;
- Xf – *Xylella fastidiosa* – *Xylella*;

Resumo

Análise comparativa entre os genomas dos fitopatógenos *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Xylella fastidiosa (*Xf*) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) são gama proteobactérias gram negativas, responsáveis por grandes perdas econômicas no setor citrícola brasileiro. Com seus genomas seqüenciados e anotados, fizemos uma análise comparativa entre suas composições gênicas e seus ambientes de vida. *Xac* apresenta um genoma de 5.2Mb contra 2.7Mb de *Xf*. Isto reflete no número de genes (4432 contra 2838) que acabam refletindo em uma maior complexidade metabólica de *Xac*, caracterizada por: uma extensa gama de genes de degradação de parede celular (44), biossíntese de proteases (92), genes de funções regulatórias (296), um completo metabolismo energético (209), quimiotático (inexistente em *Xf*) e secretório (presença dos tipos I, II, III e IV, sendo o II em duplicata), além de um grande número de genes envolvidos com captação de ferro (65), fazem de *Xac* um patógeno de alto poder invasivo e de rápida propagação e virulência. Em contrapartida, *Xf* por não possuir a complexidade supracitada, parece ter seus recursos adaptados ao ambiente em que vive, como por exemplo um alto número de genes envolvidos com biossíntese de pili, que associado à biossíntese de goma, favorecem sua adesão nas glândulas salivares do vetor (cigarrinha) e a formação de aglomerados celulares responsáveis pelo entupimento dos vasos que levam às patologias decorrentes do evento.

Palavras-chave: *Xanthomonas*; *Xylella*; Genomas; Fitopatógenos; Análise Comparativa; Metabolismo.

Abstract

Comparative analysis between the genomes of the phytopathogens *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

Xylella fastidiosa (*Xf*) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (*Xac*) are gram negative gamma proteobacteria, responsible for great economical losses in the Brazilian citrus sector. With their sequenced and annotated genomes, we have done a comparative analysis between their genetic composition and life habitat. *Xac* displays a genome of 5.2Mb against 2.7Mb of *Xf*. This reflects the number of genes (4432 against 2838) which results in a greater metabolic complexity of *Xac*, characterized by: a wide range of genes of cell wall degradation (44), biosynthesis of proteases (92), many genes of regulatory functions (296), a complex energy metabolism (209), chemotactic (absent in *Xf*) and secretory systems (presence of types I, II, III and IV, type II in duplicate), besides a great number of genes involved in iron acquisition (65), make of *Xac* a pathogen of high invasive power and of quick spreading and virulence. In the other hand *Xf*, due to the lack of the complexity just cited, seems to have its resources adapted to the habitat in which it lives, as for example a large number of genes involved in pili biosynthesis, that associated with gum biosynthesis, favor its adhesion to the salivary glands of the vector (sharpshooter) and the formation of cellular agglomerations responsible for the blockage of the vessels which leads to the pathologies resulted from this event.

Key Words: *Xanthomonas*; *Xylella*; Genomes; Phytopathogens; Comparative analysis; Metabolism.

1 - Introdução

1.1 - *Xanthomonas citri* e o Cancro Cítrico

Bactérias do gênero *Xanthomonas* são classificadas como gama proteobactérias gram negativas e apresentam-se sob a forma de bacilos, medindo entre 0.2 e 0.6 μm de diâmetro e 0.8 a 2.9 μm de comprimento (Swings, J.G. and Civerolo, E.L., 1993) (ver figura 1). Esta amplitude de variação morfológica é dada principalmente ao grande número de espécies (*albilineans*, *axonopodis*, *campestris*, *fragariae*, *populi*, *maltophilia* e *oryzae*) e patovares (só no gênero *campestris* com aproximadamente 140 patovares fenotipicamente distinguíveis) (Swings, J.G. and Civerolo, E.L., 1993). Infecções provocadas por bactérias deste gênero já foram descritas em pelo menos 124 espécies de plantas monocotiledôneas e 268 dicotiledôneas, com as mais diversas características patológicas, sendo destacadas reações de necrose, gomose (que pode caracterizar doenças vasculares ou parenquimatosas), e danos em folhas e frutos de inúmeras espécies, que podem acarretar inúmeras perdas na economia agrícola de um país (Long, S. R. and Staskawicz, B. J., 1993), como por exemplo no caso dos frutos da laranjeira de grande interesse comercial para o Brasil, por liderar a exportação de citros e suco de laranja ao lado da Flórida - EUA (Machado, M.A., 1997).

Figura 1 – Microscopia eletrônica de *Xanthomonas citri* em meio de cultura.
Fonte – Prof. Dr. Elliot Kitajima ESALQ/USP.

Em meio de cultura *Xanthomonas* é capaz de formar colônias isoladas, após 3 dias de incubação em uma temperatura constante de 28°C, com diâmetros que variam de 2 a 10 mm com cerca de $10^4 - 10^5$ células /mm. É um bactéria sensível a pH's inferiores a 4.5, sendo considerado ideal um limiar de variação entre 6.5 e 7.0. Apresentam como características clássicas uma coloração amarelada, devido à produção de xanthomonadinas (pigmentos à base de mono- ou dibromo-aril (Andrews, A.J., 1973,1976)) e de aspecto mucóide, dado provavelmente pela produção e liberação de goma xanthana (Swings, J. and Civerolo, E.L., 1993). Devido às diferentes tonalidades de amarelo, observadas em culturas de diferentes espécies de *Xanthomonas*, esta variação pode ser utilizada como fator de classificação taxonômica e fenotípica. Por ser um patógeno aeróbico, necessita de aeração durante o seu cultivo, sendo resistente a um amplo espectro de antibióticos beta lactâmicos. Não é capaz de formar esporos sob condições de estresse fisiológico.

Xanthomonas axonopodis pv *citri* (*Xac* – *Xanthomonas*) é uma bactéria capaz de infectar culturas citrícolas, no entanto, apresenta características epífitas por viver, em alguns casos, nos

Figura 2: Esquerda - lesão foliar em forma de galeria provocada pela larva minadora dos citros (*Phyllocnistis citrella*), associada a uma infecção por *Xanthomonas citri* e formação do cancro. Direita - Idem para a foto da esquerda, porém com lesões no pecíolo foliar.

Fonte – Fundecitrus Home Page

tecidos vegetais externos sem provocar danos ao mesmo. Ao encontrar lesões ou aberturas naturais nos tecidos vegetais que permitam a sua entrada (estômatos, hidatódios ou lenticelas) (Rudolph, K, 1980), muda suas características de epífita para parasita. Tendo em vista este modelo de contaminação, a presença das larvas minadoras dos citros (*Phyllocnistis citrella*) facilitam a contaminação por *Xanthomonas*, uma vez que formam pequenas lesões em forma de galerias nos tecidos vegetais, tornando-se uma porta de entradas para esta bactéria.

Curiosamente as lesões provocadas por *Xanthomonas* na presença desta larva tendem a acompanhar a construção das galerias (ver figura 2). Por apresentar um flagelo em um dos seus pólos (monotríquia), possui uma maior facilidade de locomover-se (por eventos de quimiotaxia) até uma abertura, via lâminas d'água que se forma ao longo das folhas. Sendo assim, são considerados vetores de contaminação quaisquer animais, ou até mesmo o trânsito indiscriminado de pessoas entre pomares contaminados e pomares saudáveis.

Sua propagação pós contaminação, dá-se à partir das próprias lesões, onde gotas d'água, provenientes da chuva, promovem o rompimento das saliências (cancro), liberando as bactérias para contaminarem outras partes da planta, pelo mesmo modelo citado acima. A exudação foliar é um fenômeno natural da planta que pode promover o mesmo efeito das chuvas em pomares contaminados. Este é o motivo pelo qual conseguimos observar múltiplas lesões em uma região vegetal, formadas por colônias bacterianas isoladas (ver figura 3). *Xanthomonas* não é capaz de infectar os vasos de condução de seiva vegetal (lenhosos e liberianos), portanto não pode ser considerada uma bactéria sistêmica, diferentemente do observado em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ao infectar brássicas, dando uma doença conhecida como a podridão negra do repolho, ou em *Xylella fastidiosa* na caracterização da CVC.

Figura 3 – Formação das saliências (cancro) de ambos os lados da folha. Repara-se que a disseminação dá-se por formação de colônias isoladas..

Fonte – Fundecitrus Home

Uma vez no interior da planta, acaba alojando-se nos espaços intersticiais dos tecidos vegetais, em especial na derme foliar, um ambiente extremamente rico em substâncias nutritivas e com altas concentrações de compostos orgânicos, onde começa a provocar os primeiros danos e o cancro propriamente dito (Timmer, L.W.. et al, 2000). Painéis de microscopia eletrônica de *Xanthomonas citri* em seu ambiente de vida apresentam-se em destaque no anexo 12.

O cancro cítrico é caracterizado principalmente por lesões salientes, característica esta, única entre lesões provocadas por outras doenças e pragas, onde os primeiros sinais são

Figura 4 – Formação das saliências (cancro) nos frutos. Com a doença há total perda da estética do fruto, promovendo inclusive rupturas da casca em estágios mais avançados..

Fonte – Fundecitrus Home Page

pequenas manchas amareladas que crescem aos poucos, tornando-se marrons num período mais avançado, sendo que nas folhas os mesmos aparecem de ambos os lados. Nos ramos do caule as saliências são ainda mais evidentes como se fossem crostas. Nos frutos as saliências tendem a romper sua casca, prejudicando ainda mais a estética e consumo deste fruto (Timmer, L.W.. et al, 2000) (ver figura 4).

Por ser considerada uma bactéria de alta patogenicidade, no momento a melhor forma de combatê-la é prevenir a contaminação do pomar. Isso pode ser feito tendo-se um controle maior na produção e distribuição das mudas, esterilizando equipamentos e utensílios por meio de bactericidas (como por exemplo amônia quaternária), controlar o trânsito de pessoas e veículos nos pomares e eliminar focos de presença da larva minadora, entre outras (Fundecitrus Home Page).

1.2 - *Xylella fastidiosa* e o CVC

Xylella fastidiosa (**Xf - *Xylella***) é uma gama proteobactéria gram negativa pertencente ao grupo das *Xanthomonas*. Apresenta-se sob a forma de um bacilo com cerca de 0.3 a 0.5 µm de diâmetro e 1 a 5 µm de comprimento. Possui um genoma circular de 2.7 Mb, associados geralmente a plasmídeos. Não possui flagelo e não é capaz de formar esporos quando submetida a condições de estresse fisiológico. No entanto, é capaz de formar grumos, talvez associados à biossíntese de goma e funcionalidade das fimbrias, que acabam por entupir os vasos de condução de seiva vegetal acarretando as características que são peculiares da doença (ver figura 5). É considerada uma bactéria limitada ao xilema, definição esta dada pelo fato de viver exclusivamente no xilema vegetal, apresentando um lento crescimento, o que a caracteriza como sendo fastidiosa dentro do grupo de bactérias a que pertence (Brlansky, R.H. et al., 1991 e Purcell, A.H. & Hopkins, D.L., 1996).

A transmissão e contaminação de culturas citricolas por esta bactéria dá-se única e exclusivamente por ação de insetos sugadores, conhecidos como “cigarrinhas” da subfamília

Figura 5 – Microscopia eletrônica mostrando o corte transversal de xilema de citro infectado por *Xylella fastidiosa*. Repare que conglomerados bacterianos entopem os vasos, que acabam por provocar os sintomas descritos para a doença.

Fonte – Prof. Dr. Elliot Kitajima ESALQ/USP.

Cicadellidae (Lopes, J.R.S. and Barreta, M.J.G., 1996) (ver figura 6). A dependência do inseto como vetor de propagação, ocorre pelo fato destas bactérias não possuírem um sistema ou complexo de locomoção, capaz de promover sua auto penetração no tecido hospedeiro. O inseto, ao inocular seu aparelho bucal nos vasos lenhosos do vegetal, na tentativa de capturar seu alimento, a seiva bruta, acaba transferindo a bactéria que encontra-se alojada temporariamente em suas glândulas salivares, para a planta (Purcell, A.H. and Finlay, A.H., (1979). A seiva bruta é uma solução que apresenta uma distinta concentração de ácidos orgânicos, aminoácidos e íons inorgânicos, dependendo da

espécie vegetal, idade, saúde entre outras características (Hopkins, D. L., 1989). No entanto, o que chama mais a atenção é que 70% da fonte de nitrogênio dispersa nesta solução é representada por glutamina. Portanto, meios para crescimento desta bactéria “*in vitro*”, devem conter altas concentrações de glutamina além dos macro e micronutrientes, destaque para o cálcio e potássio por estarem presentes em maior concentração. Culturas de *Xylella*

Parathona gratiosa

Acrogonia sp

Figura 6 – Exemplos de vetores de propagação de *Xylella fastidiosa* em lavouras citricolas.

Fonte – Fundecitrus Home Page

submetidas a uma temperatura constante de 28°C com baixa aeração (cerca de 150 rpm) em um meio definido (que contenha quantidades proporcionais dos compostos citados acima), perduram por pelo menos 2 semanas até que se possa ter uma concentração de bactéria favorável para análises experimentais.

Uma vez no interior da planta, *Xylella* é capaz de provocar uma doença conhecida como CVC (Clorose Variegada dos Citros), observada primeiramente em 1987 em laranjeiras da região de Bebedouro, São Paulo – Brasil. Também conhecida como “amarelinho”, devido às características patológicas desta doença, a clorose tem se propagado intensamente nos pomares das plantações brasileiras (Salva, R.A. et al., 1995). É capaz de infectar todos os tipos de culturas citrícolas, no entanto, tangerinas, limões e alguns híbridos comerciais são considerados tolerantes à doença (Machado, M., 1997). Entre os anos de 1987 e 1993 a doença já havia sido observada em pelo menos três estados da região sudeste (São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro) além do Paraná. Atualmente pode ser considerada a doença mais severa que ataca os pomares da citricultura nacional (Fundecitrus Home Page). Já foi encontrada em outras espécies vegetais além dos citros, como por exemplo pessegueiros, amoreiras, alfafa, carvalho e videiras, onde provoca uma doença conhecida como doença de Pierce (Paradela, O.F., et al. 1996).

Como o próprio nome já diz, a CVC é caracterizada pelo aparecimento de pontos amarelados (clorose) dispersos pelos caules e folhas, principalmente nas regiões inter-nervuras

Figura 7 – Principais sintomas provocados pela CVC. Redução no tamanho do fruto (esquerda), que acaba tendo uma consistência pétrea; e a clorose foliar (direita).

foliares. Quando as bactérias infectam novos brotos, os mesmos passam a ter um crescimento retardado que acaba influenciando no tamanho reduzido da planta. Esta diminuição também é observada nos frutos, dando-lhes uma consistência pétrea, com alto teor de acidez e uma coloração amarelada bem mais intensa do

que a observada em frutos sadios (ver figura 7).

Apresenta também manchas marrons e amadurecimento precoce, que acabam por influenciar

a perda dos frutos, uma vez que os mesmos passam a não ter aceitação de consumo, acarretando grandes perdas nas somatórias de capital agrícola (Menegucci, J.L.P et al., 1995). Este é o motivo pelo qual *Xylella*, em julho de 2000, teve seu genoma seqüenciado e anotado pela rede ONSA/FAPESP formada por pesquisadores do Estado de São Paulo (Simpson, A.J.G. et al., 2000). Atualmente, trabalhos para averiguação funcional dos genes de *Xylella fastidiosa* estão em andamento (<http://watson.fapesp.br/funcional/titulos.htm>).

1.3 – Sequenciamento e anotação do genoma de *Xanthomonas citri*

O objetivo fundamental de todo projeto genoma é inicialmente obter a sequência nucleotídica de seu material genético (cromossomal e plasmidial(ais) quando existente(s)), para que a partir daí possa ser determinada as funções de cada um dos genes, direcionando o aprofundamento dos estudos. No entanto, para termos êxito no término do mesmo, pelo menos oito fases ou passos dentro do projeto devem ser levados em conta, são eles: **i)** montagem das bibliotecas de clones; **ii)** sequenciamento dos insertos; **iii)** fechamento do genoma por montagem das sequências lidas; **iv)** determinação das ORF's (fases de leituras abertas) ou **CDS** (sequências codificadoras); **v)** caracterização funcional destas fases de leituras (anotação); **vi)** categorização gênica; **vii)** determinação das vias metabólicas; e **viii)** análise do metaboloma (maiores detalhes de cada uma das sequências supracitadas são apresentadas nas metodologias).

Como são fases sequenciais, possíveis erros ou falhas cometidas nas fases iniciais, podem propagar erros nas fases posteriores, que acabam se tornando “bolas de neve” (Kyrpides, N. C. and Ouzounis, O.A., 1999). Isso poderia se complicar ainda mais se sequências com informações errôneas, forem depositadas no banco de genes sem uma prévia conferência de sua veracidade por algum **curador**. Pesquisadores que por ventura, vierem a usufruir estas informações na obtenção de seus resultados, poderão perpetuar erros ainda maiores.

1.4 - Genes de virulência e patogenicidade

Um dos principais objetivos do estudo da interação planta-patógeno relaciona-se com a compreensão dos mecanismos moleculares de reconhecimento da planta pelo organismo causador da doença, capazes de resultar na compreensão sobre a patologia como um todo. Desta forma, um grande número de genes capazes de promoverem a resistência em algumas plantas foram isolados e caracterizados. Estes genes encontrados nos próprios patógenos, neste caso bactérias gram negativas, correspondem aos chamados genes *avr* (**avirulência**) (Godiard, L. et al, 1994). Portanto, tal interação deve-se à presença ou ausência de genes de resistência na planta (capazes de reconhecerem genes específicos de patogenicidade bacteriana) e de genes de avirulência no patógeno (capazes de provocarem o reconhecimento do sistema de defesa vegetal).

Desta forma, podemos classificar as interações de duas formas: **compatível** quando a planta não possui recursos de reconhecimento e defesa (genes R) contra os genes *avr* do patógeno, o que leva ao desenvolvimento da doença propriamente dita; **incompatível**, quando a planta possui recursos de reconhecimento e de ativação do seu sistema de defesa, contra os genes *avr* do patógeno. Neste caso, ocorre uma reação denominada de reação de hipersensibilidade (HR), caracterizada por uma necrose das células ao redor da região infectada, limitando a disseminação do patógeno. Esta necrose é induzida por uma resposta química da planta, que aumenta a permeabilidade das células induzindo a lise por hiperosmolaridade (Daniels, M. J. and Leach, J. E., 1993).

Em ambas as interações há uma resposta vegetal em detrimento da presença do patógeno, conhecida como **resposta sistêmica adquirida** (SAR). No entanto, em interações incompatíveis tal reação é mais eficiente, e se propaga por um tempo mais longo em todo o vegetal, sendo capaz de induzir uma resistência vegetal para outros patógenos, diferentes do que induziu a reação (Ryals, J. et al, 1994). Em níveis moleculares, podemos dizer que esta resistência está diretamente associada a expressão dos genes SAR, responsáveis por esta função. Um dos compostos relacionados com a indução da resposta sistêmica, no processo de defesa das plantas, é o ácido salicílico (SA), biossintetizado à partir da via do mevalonato (Vernooij, B. et al, 1994;). Além disso, o etileno e o ácido jasmônico (reguladores do crescimento vegetal) participam de tal fenômeno de resistência (Xu, Y. et al, 1994).

Pelo menos 30 genes *avr*'s já foram bem descritos e caracterizados na literatura, em diferentes gêneros bacterianos: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Yersinia* entre outros (Leach, J. E. and White, F. F., 1996). O produto do gene *avr* está relacionado, não só ao mecanismo de ativação da resistência (HR e SAR), como também a especificidade por um cultivar. Estes genes *avr* apresentam características estruturais em comum, como por exemplo, codificam proteínas hidrofílicas

de 20-100 kDa e no caso dos genes da família **avrBs3** há a peculiaridade da existência de um peptídeo sinal, com repetição de 34 aminoácidos, capaz de ser reconhecido pelo núcleo das células vegetais. (Yang, Y. and Gabriel, D. W., 1995).

Além dos produtos dos genes **avr's**, os patógenos, também sintetizam outras proteínas relacionados com a hipersensibilidade e patogenicidade, são as proteínas oriundas da expressão dos genes **hrp's**. Existem genes altamente conservados entre patógenos de animais e vegetais, e suas principais funções relacionam-se com a própria formação do sistema secretório tipo III, responsável pela secreção dos genes **avr's** (síntese e exportação de fatores de virulência); quimiotaxia e transporte de moléculas da planta para a bactéria (Baker, B. et al, 1997). Mutações tanto nos genes **avr** quanto nos genes **hrp** podem promover pleiotropia, com destaque para a redução dos níveis de infecção e até mesmo da reação da planta (HR ou SAR).

Os genes de resistência por parte dos vegetais, responsáveis pelo reconhecimento dos genes **avr**, codificam proteínas que apresentam um domínio em repetições ricas em leucina (LRR), podendo conter outros domínios comuns tais como: o zíper de leucina (LZ), o domínio de reconhecimento proteína-proteína (TIR), o transmembrana, rico em resíduos hidrofóbicos (DT), o sítio de acoplamento à membrana (N-miristilação), o sítio de ligação à nucleotídeo (NBS) ou o domínio com função catalítica (CAT - quinase) (Staskavicz, B. J., et al, 1995). Além destas proteínas supra citadas e das respostas sistêmica (SAR) e hipersensível (HR), as plantas são capazes de ativarem outros recursos de proteção como por exemplo: aumento na produção de espécies reativas de oxigênio; biossíntese de fitoalexinas; reforço na estrutura da parede celular; liberação de enzimas hidrolíticas ou de proteínas de ação inibitória. Todos estes recursos podem ser comparados aos recursos imunológicos existentes em organismos de animais superiores, no entanto muito estudo ainda precisa ser feito com o intuito de desvendarmos um pouco mais da interação planta hospedeiro, afim de focarmos cada vez mais o estudo na cura de doenças vegetais que prejudicam tanto as economias agrícolas de todo o mundo.

2 - Objetivos

O objetivo desta dissertação é analisar o metabolismo intermediário de *Xanthomonas citri*, com base nos dados de anotação da categoria I (metabolismo intermediário), comparando-o com o metabolismo intermediário de *Xylella fastidiosa*, afim de obtermos um perfil global do metabolismo energético destas duas bactérias, relacionando-as aos seus ambientes de vida e às patologias provocadas, nas plantas susceptíveis às suas infecções (citros). A idéia de fazer-se uma comparação minuciosa entre estes dois patógenos deu-se pelo fato de ambas pertencerem a um mesmo grupo taxonômico (bactéria, proteobactéria, subdivisão gama, grupo *Xanthomonas*); por serem capazes de infectar o mesmo hospedeiro (citros), provocando patologias diferenciadas; e por viverem em diferentes ambientes dentro do vegetal (*Xylella* – xilema e *Xanthomonas* – mesófilo foliar).

Destas análises pretendemos selecionar genes que são comuns entre elas, que caracterizariam vias metabólicas conservadas, e ao mesmo tempo, genes que são exclusivos de cada organismo, que caracterizariam, por exemplo, vias de infecção e adaptação.

3 - Metodologias

3.1 – Sequenciamento e obtenção das regiões codificadoras (CDS)

Xanthomonas axonopodis pv. *citri* (strain 306) teve seu material genético isolado e submetido a sequenciamento usando-se a metodologia de “shotgun” (Fleischmann, R. D. et al., 1995) (acompanhe figura 8). Foram geradas bibliotecas de pUC18 com insertos que apresentavam entre 1 e 4 kb de tamanho, totalizando 205.408 leituras de sequenciamento (*reads*) (ver figura 9).

Além disso, bibliotecas de cosmídeos (*lawrist vector*) foram geradas com insertos de 30 a 40 kb de tamanho. Da mesma forma que nos plasmídeos, nos cosmídeos, apenas suas pontas foram sequenciadas, resultando 7.380 terminações que puderam ser comparadas e montadas junto com as bibliotecas de plasmídeos, pelo pacote de programas **phred/phrap/consed** (Gordon, D. et al., 1998), associado ao programa de montagem de *scaffolding*, construído pelo grupo de bioinformática, membros do projeto de sequenciamento.

Figura 8 – Esquema representativo das fases de: montagem das bibliotecas; sequenciamento; fechamento do genoma; procura e anotação das CDS's; e categorização dos genes putativos, ocorridos no genoma de *Xanthomonas citri*.

Durante o fechamento do genoma, acabamos tendo 103 lacunas (*gaps*), caracterizadas como regiões onde as seqüências dos *contigs* não se sobrepunham, pelo grande número de regiões repetidas, que acabavam prejudicando a eficácia dos programas computacionais citados acima. Para resolver este problema, novas baterias de seqüenciamento de plasmídeos (20) e cosmídeos (49) foram feitas, porém as mesmos foram seqüenciados por completo.

Toda esta análise de verificação da conclusão do seqüenciamento, foi acompanhada de acordo com um gráfico de evolução do fechamento do genoma de *Xanthomonas* apresentado na figura 9. Durante esta análise conseguíamos ter uma noção de quantos clones ainda teríamos que seqüenciar, tendo como base de verificação a formação de *contigs* (seqüências de leituras que apresentaram similaridade de sobreposição entre elas). Observa-se que a formação de *contigs* de 5 Kb atinge seu pico em aproximadamente 20.000 leituras (*reads*), decaindo após estes valores, o que era de se esperar, uma vez que *contigs* maiores acabam se formando pela união deles, até que seja formado uma única seqüência, onde teríamos o genoma completamente fechado.

Ao final desta fase obtivemos uma seqüência nucleotídica única no formato Fasta, de todo o genoma de *Xanthomonas* (*one contig*). Esta montagem das seqüências foi confirmada por mapa de restrição (Hoheisel, J.D. et al., 1993).

Figura 9 – Evolução do sequenciamento das bibliotecas de plasmídeos e cosmídeos, e análise do fechamento do genoma de *Xanthomonas*, à partir da montagem de *contigs*. Um *contig* representa uma região do genoma que acabou se fechando, e que ao término do projeto deverá corresponder a uma única seqüência.

Esta sequência foi submetida a uma análise e predição de sequências codificadoras (CDS's), por programas como o Glimmer (Delcher, A. L. et al, 1999) e Genemark (Borodovsky, M. et al, 1995). As CDS's encontradas por estes programas, correspondem a prováveis sequências gênicas existentes entre dois *códons* de terminação, nas seis fases de leitura que uma sequência de DNA pode formar, daí a denominação. Com as CDS's definidas, passamos a inferir uma função putativa a estes genes (anotação) e consequentemente, passamos a agrupar os genes que relacionavam-se com uma mesma via metabólica em categorias. Cada uma destas categorias (ver tabela 1) acabou sendo submetida a uma minuciosa análise, por um subgrupo de pesquisa dentro do projeto. O passo seguinte foi determinar as vias metabólicas a que pertencem, e a sua função na regulação metabólica do organismo. Estas vias metabólicas pré-determinadas forneceram ricas informações que puderam ser relacionadas ao ambiente de vida e a um processo evolutivo, quando comparado com outros organismos. À partir daí iniciou-se uma fase conhecida como pós genoma, onde as CDS's ficaram a disposição para serem averiguadas por análises funcionais, que fornecerão informações mais concisas e precisas, em relação à sua funcionalidade.

Categorias
I – Metabolismo Intermediário
II – Biossíntese de Pequenas Moléculas
III – Metabolismo de Macromoléculas
IV – Estrutura Celular
V – Processos Celulares
VI – Elementos Genéticos Móveis
VII – Patogenicidade, Virulência e Adaptação
VIII - Hipotéticas
IX - CDS's com categoria indefinida

Tabela 1 – classificação primária das categorias gênicas do genoma de *Xanthomonas citri* (maiores detalhes ver anexo 11)

3.2 – Anotação, categorização e análise das vias metabólicas

A anotação consiste em se determinar a provável função das CDS's baseando-se em similaridades de sequências e em dados já descritos na literatura. Para isso, inúmeras ferramentas de bioinformática foram utilizadas. Das 4332 CDS's encontradas no genoma de *Xanthomonas*, o laboratório a que pertencemos (QR – Instituto de Química da Universidade de São Paulo), sob os cuidados da professora Dra. Ana Cláudia Rases da Silva, ficou responsável pela anotação e descrição das vias metabólicas envolvidas no metabolismo intermediário (I) desta bactéria, com 720 CDS's (16% do genoma). Esta categorização foi feita por tradução e alinhamento das sequências utilizando-se o programa Blast (Altschul, S.F. et al., 1990) contra o banco de genes, baseando-se na anotação do genoma de *E. coli* (Blattner, F. R., 1997), e utilizando-se como padrão as categorias gênicas do genoma de *Xylella fastidiosa* (Simpson, A.J.G. et al., 2000).

Porém, diferentemente do que ocorreu com o processo de anotação em *Xylella fastidiosa*, o genoma de *Xanthomonas citri* foi anotado em três fases:

I - anotação automática – foi caracterizada por não haver atuação direta dos anotadores, onde todos os dados foram obtidos de forma automatizada:

- Obteve-se a sequência Fasta que compreende todo o genoma (phred/phrap/consed);
- Foram determinadas as CDS's (delimitadas entre dois *códons* de terminação), por grau de similaridade com as sequências depositadas no banco de genes (Glimmer e Genemark);
- Inferiu-se uma pressuposta função a estes genes (Blast/COG/Pfam/Psort),
- Classificou-se os genes em categorias funcionais (Kegg/EcoCyc);

II - verificação da anotação automática – os genes que apresentavam menores similaridades entre as sequências comparadas, foram verificados por anotadores que ficaram incumbidos de analisar todas as informações contidas em suas respectivas CDS's de responsabilidade (de acordo com as categorias pré definidas), fazendo quaisquer alterações que julgassem corretas e necessárias, através da averiguação dos resultados emitidos pelos programas citados na fase I. Desta forma, teríamos dois processos de certificação da veracidade das informações dadas a cada CDS, a primeira concedida pela fase automatizada e a outra dada pela fase manual, caracterizada a seguir;

III – anotação manual – nesta fase uma pequena fração das CDS's foram submetidas a uma análise mais complexa dos dados, em relação às suas funções pressupostas, uma vez que o baixo grau de similaridade de sequências, não permitiu que as mesmas fossem capturadas pelo sistema automatizado de anotação descrito na fase inicial.

Esta metodologia de anotação, baseada na estrutura de uma pirâmide (ver figura 10), tendo como base as CDS's que apresentavam maior similaridade de sequências, fez com que todas as CDS's consideradas problemas (por gerarem dúvida interpretação) fossem deixadas para o final (topo), economizando com isso o tempo gasto no processo de anotação. O que é mais importante, com as categorizações de cada CDS, os laboratórios poderiam começar a trabalhar isoladamente em seus projetos individuais, sem terem que esperar o completo fechamento do genoma para o fazerem.

Figura 10: Esquema representativo de como se procedeu o processo de anotação das CDS's do genoma de *Xanthomonas citri*, utilizando-se para isso as ferramentas de bioinformática. A base da pirâmide compreende genes que foram anotados durante a fase primária de anotação. A parte intermediária representa os genes que sofreram uma intervenção dos responsáveis pelas respectivas categorias. O topo representa genes que acabaram sendo anotados com base nos desenhos das vias metabólicas.

Utilizando-se recursos de bioinformática e uma página de anotação totalmente interativa (ver anexo 1), mantida e coordenada pelo Dr. João Paulo Kitajima do Instituto de Computação da Universidade de Campinas, anotamos todas as CDS's que faziam parte da categoria I – metabolismo intermediário, em *Xanthomonas citri*. Esta página dispunha de recursos diferenciados, que favoreciam a análise de seqüências dos pressupostos genes. Dentre as ferramentas utilizadas destacam-se: **Blast** (Altschul, S.F. et al., 1990), que permite fazer uma comparação utilizando alinhamento local entre uma seqüência de interesse e seqüências de referência depositadas no banco de genes (Benson, D.A. et al., 2000); **Pfam** (Sonnhammer, E.L.L. et al., 1997), que compara domínios funcionais conhecidos depositados num banco de dados curado, contra a seqüência a ser analisada; **COG** (Tatusov, R.L. et al., 1997), que tem a finalidade de procurar grupos de proteínas ortólogas (presentes em outros organismos); e **Psort** (Nakai, K. and Kanehisa, M., 1991) que determina a provável localidade da putativa proteína na célula, com base na seqüência **Fasta** da mesma.

Além destes recursos disponíveis na página de anotação, outros recursos foram essenciais para a análise das seqüências classificadas. A determinação das reações enzimáticas e vias metabólicas em que os produtos gênicos participavam, foram tomadas como base à partir dos programas: **EcoCyc** (Karp, P.D. et al., 2000), um banco de dados curado que apresenta a classificação de todos os genes envolvidos no metabolismo de *E. coli*, bem como as vias metabólicas que este organismo dispõe para realizar suas funções vitais; **Kegg** (Kanehisa, M. and Goto, S., 2000), um banco de dados similar ao EcoCyc, no entanto, as vias metabólicas e genes de que dispõe estão relacionados aos principais genomas seqüenciados e depositados. Desta forma, eventuais genes ou vias que não se apresentavam em *E. coli* poderiam ser supridas, utilizando-se este programa; e **Swiss-prot** (Bairoch, A. and Apweiler, R., 2000), que não é uma ferramenta exclusiva para determinação de vias

metabólicas, mas apresenta concisas informações sobre vias e reações metabólicas que auxiliam o anotador a compreender o processo bioquímico abordado.

Todas as informações obtidas à partir destas ferramentas, foram analisadas e muitas vezes comparadas entre si, permitindo ao anotador basear-se em diferentes recursos para determinar as prováveis funções das CDS's analisadas e vias metabólicas correspondentes. O resultado desta análise era descrito de forma simples em um campo (*remark*) onde após a publicação do trabalho, estas informações seriam submetidas ao banco de genes mantido pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.3 – Análise da organização estrutural dos genes nos genomas dos fitopatógenos *Xanthomonas citri* e *Xylella fastidiosa*

Utilizando-se os programas gerados pelos Drs. Nalvo A. Júnior (UFMS) e João Carlos Setubal (UNICAMP), membros da equipe de seqüenciamento e anotação do genoma *Xanthomonas*, fomos capazes de comparar as regiões que apresentavam uma mesma organização estrutural em ambos os genomas (Setubal, J. C. and Almeida Jr., N. F., 2001). Para este tipo de análise o programa contava com alguns conceitos e inferências (ver figura 11):

- os genomas foram comparados partindo-se de uma mesma suposta origem de replicação (*DnaA* - iniciador da replicação cromossomal);
- o grupo de CDS's com mesma organização poderia estar disposto de forma **paralela**, ou seja, em ambas as bactérias a organização dá-se no mesmo sentido das fitas, como por exemplo 5' → 3'; ou de forma **antiparalela**, ou seja, enquanto em um genoma a organização dá-se em um sentido (5' → 3'), no outro genoma encontra-se na fita complementar;
- Definiu-se como **BBH** (*Bidirectional Best Hit*) a melhor similaridade recíproca entre duas seqüências comparadas, ou seja, o par de genes ortólogos;
- Definiu-se como **run** a organização estrutural dada por pelo menos 4 CDS's semelhantes e na mesma ordem nos dois genomas, sendo pelo menos três delas BBH;
- Definiu-se como **cluster** a região que contém no mínimo dois **runs**, separados por até 300 pb;
- A inclusão de pequenas CDS's hipotéticas dentro dos **runs** foram desprezadas;

Observações: O número 4 como sendo a condição mínima de determinação de um **run**, não foi aleatória, pois se diminuíssemos este valor para 3, a quantidade de **runs** a serem verificados seria muito grande e pouco explicativo, devido ao fato de termos uma baixa estringência. No entanto, se aumentássemos este número para 5, o total de **runs** encontrados seria baixo, devido a uma alta estringência da busca.

Figura 11: Esquema representativo dos critérios utilizados para verificação das regiões que apresentavam as mesmas organizações estruturais de suas CDS's entre dois genomas. A e B são dois diferentes genomas, que podem ser comparados de forma paralela ou antiparalela, no que diz respeito à similaridade e organização de seus genes (acompanhar cores). As definições de *run* e *cluster* apresentam-se no texto acima.

#	Genomas considerados	sigla
1	<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	XF
2	<i>Xanthomonas citri</i>	XI
3	<i>Xanthomonas campestris</i>	XA
4	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str.C58 circular chrom.	AT
5	<i>Aquifex aeolicus</i>	AA
6	<i>Bacillus halodurans</i>	BH
7	<i>Bacillus subtilis</i>	BS
8	<i>Borrelia burgdorferi</i> CDSeri	BB
9	<i>Buchnera</i> sp. APS	BU
10	<i>Caulobacter crescentus</i>	CC
11	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	CA
12	<i>Clostridium perfringens</i>	CP
13	<i>Escherichia coli</i> K12	EC
14	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	HI
15	<i>Helicobacter pylori</i> 26695	HP
16	<i>Mesorhizobium loti</i>	ML
17	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	MT
18	<i>Neisseria meningitidis</i> MC58	NM
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA
20	<i>Ralstonia solanacearum</i>	RS
21	<i>Rickettsia conorii</i>	RC
22	<i>Rickettsia prowazekii</i>	RP
23	<i>Salmonella enterica</i> subs. <i>enterica</i> serovar Typhi	SE
24	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	ST
25	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	SM
26	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> N315	SA
27	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	SP
28	<i>Vibrio cholerae</i>	VC
29	<i>Yersinia pestis</i>	YP

Tabela 2 – Organismos que fizeram parte dos processos de análise de BBH e comparação entre os *runs* de conservação.

Com os resultados iniciais fornecidos por este programa, passamos a adentrar na organização e sequência de cada CDS dos *runs*, que apresentavam qualquer relação com eventos de patogenicidade, virulência, ou até mesmo de adaptação do organismo ao ambiente (descritos mais adiante nos resultados). Além disso, comparamos o genoma de *Xylella* com outros 28 genomas (apresentados na tabela 2). Este trabalho forneceu como resultados finais: i) genes que eram conservados e exclusivos das Xanthomoneaceas (XF, XI e XA); ii) genes que eram exclusivos dos patógenos de citros (XF e XA), e até mesmo iii) genes que eram exclusivos de cada um dos genomas. Estes dados foram fundamentais para sabermos o que se manteve conservado durante o processo evolutivo, e tentar responder que rearranjos propiciaram as mudanças estruturais em relação ao genoma destes dois organismos.

3.4 – Análise filogenética

Utilizamos dois algoritmos diferentes para reconstrução das topologias filogenéticas, em relação aos genes de interesse (genes *Tsr* e *FimA*): **UPGMA** e **Neighbor Joining**.

Em ambos os casos as matrizes foram geradas pelo programa **JalView** de alinhamento múltiplo de seqüências (<http://www2.ebi.ac.uk/~michele/jalview/contents.html>), utilizado para gerar o grupo de CDS's paralogas de *Xanthomonas citri* (<http://genoma4.iq.usp.br/projects/citri/paralogous/index.html> - restrito a membros do projeto de seqüenciamento e anotação).

O **UPGMA** (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages) consiste em um algoritmo simples, e assume o relógio molecular para construir a topologia gênica, ou seja, assume que todos os taxons ou seqüências evoluem sobre uma taxa de mutação constante (Mount, D. W., 2001). Agrupa um par de taxons (1 e 2) com menor distância (mais similares) e recalcula a matriz de distância assumindo que estes taxons, apresentam-se com um só (1+2) (Russo, C. A. M. et al., 2001). As células da nova matriz de distâncias relativas, serão as médias de cada célula da matriz anterior, veja exemplo abaixo (Nei, M and Kumar, S., 2000):

Portanto, pode-se dizer que este método baseia-se na similaridade total das seqüências, assumindo uma mesma taxa de substituição que caracteriza o relógio molecular

Neighbor Joining consiste em um algoritmo que baseia-se no método de evolução mínima, onde procura-se encontrar a árvore filogenética com menor soma total de ramos, portanto pode ser considerado uma ferramenta de busca exaustiva dependendo do número de taxons ou seqüências que estão sendo computadas (Nei, M and Kumar, S., 2000). O passo inicial sempre baseia-se na árvore em estrela, minimizando a soma total dos ramos até encontrar o par de seqüências vizinhas (mais similares). Em seguida, procura-se um segundo par que minimize ainda mais a soma total dos ramos. Este processo se procede até o momento em que as somatórias de diferentes ramos se igualem. Neste momento, geralmente, o programa define como a primeira unidade taxonômica aquela que estiver separada da politomia. Desta forma, uma árvore gerada por este algoritmo sempre será totalmente resolvida (Russo, C. A. M. et al., 2001).

4- Resultados

4.1 – Anotação

De um total de 4332 CDS's (*Coding Sequences – Sequências codificadoras*), encontradas no genoma de *Xanthomonas citri*, ficamos responsáveis pela anotação de 720 (cerca de

16.6% do total) relacionadas ao metabolismo intermediário. Dentro desta categoria criamos subclassificações para facilitar a sua compreensão e análise. Basicamente o metabolismo intermediário acabou sendo dividido da seguinte forma: vias de degradação (72 seqüências); vias de metabolismo central (150 seqüências); vias de metabolismo energético (209 seqüências) e genes de funções regulatórias (296 seqüências). Estas quatro subcategorias apresentam-se detalhadas na tabela 3, e descritas uma a uma mais adiante.

Categoria	
I.A - Degradação	150
I.A.1 - Degradação de Poli e Oligossacarídeos	44
I.A.2 - Degradação de Pequenas Moléculas	93
I.A.3 - Degradação de Lipídeos	13
I.B - Metabolismo Central	72
I.B.1 - Açúcares e Aminoácidos	4
I.B.2 - Entner-Doudoroff	2
I.B.3 - Gliconeogênese	3
I.B.4 - Via do Glioxilato	2
I.B.5 - Metabolismo de Glicose (miscelânea)	0
I.B.6 - Pentose Fosfato (cadeia não oxidativa)	4
I.B.7 - Hidrólise de Nucleotídeos	3
I.B.8 - Interconversão de Nucleotídeos	3
I.B.9 - Compostos Fosfatados	9
I.B.10 - Interconversão de Múltiplos Propósitos	27
I.B.11 - Conversão e Biossíntese de Açúcares e Nucleotídeos	6
I.B.12 - Metabolismo de Enxofre	9
I.C - Metabolismo Energético	209
I.C.1 - Respiração Aeróbica	30
I.C.2 - Respiração Anaeróbica e Fermentação	10
I.C.3 - Transporte de Elétrons	116
I.C.4 - Glicólise	14
I.C.5 - Pentose Fosfato (cadeia oxidativa)	6
I.C.6 - Complexo Piruvato Desidrogenase	7
I.C.7 - Ciclo do TCA	18
I.C.8 - Interconversão ATP Próton Motriz	8
I.D - Funções Regulatórias	296
I.D.1 - Duplos Componentes Regulatórios	69
I.D.2 - Ativadores e Repressores	164
I.D.3 - Quinases e Fosfatases	32
I.D.4 - Fatores Sigma de Outros Componentes Regulatórios	31

Tabela 3 – Classificação dos genes pertencentes ao metabolismo intermediário de *Xanthomonas citri* e categorização de acordo com sua função putativa.

Esta anotação do genoma de *Xanthomonas citri* acabou servindo de base de anotação ao genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Uma vez que observou-se que tais bactérias apresentavam identidades superiores a 80% em pelo menos 82% de todas as suas prováveis proteínas codificadas. Ou seja, pelo menos 3429 genes entre os dois genomas, apresentaram identidade igual ou superior a 80 %. (ver artigo publicado em anexo - 15).

4.2 – Características gerais do metabolismo de *Xanthomonas citri*

4.2.1 – Degradação de macro e pequenas moléculas

Xanthomonas citri apresenta uma verdadeira maquinaria de degradação de compostos orgânicos, com destaque para os genes de degradação de oligos e polissacarídeos. Dentro deste grupo de genes encontramos:

- duas cópias de seqüências que codificam para **alfa-amilases** (EC 3.2.1.1) - capazes de hidrolisar ligações alfa 1,4 glicosídicas;
- quatro cópias de seqüências que codificam para **alfa-glicosidases** (EC 3.2.1.10) - que atuam na hidrólise das ligações alfa 1,4 de resíduos terminais de glicose, subproduto da degradação de polissacarídeos como por exemplo, glicogênio e celulose (no caso da celulose, relacionada com formação de parede celular vegetal);
- seis cópias de seqüências que codificam para **beta-galactosidases** (EC 3.2.1.23) – capazes de hidrolisar resíduos de beta-D-galactose em beta-D-galactosídeos;
- cinco cópias de seqüências que codificam para **xilanases** (EC 3.2.1.8) sendo duas truncadas – que contribuem para a hidrólise de hemicelulose, clivando ligações 1,4 beta-D-xilosídicas de xilanos;
- cinco cópias de seqüências que codificam para **xilosidases/arabinosidases** (EC 3.2.1.37) – que atuam na hidrólise de resíduos de alfa-L-arabinofuranosídeos em alfa-L-arabinosídeos;

Além dos genes supracitados, *Xanthomonas* possui uma série de outros genes em cópias únicas, mas que atuam em eventos de degradação de parede celular vegetal, como por exemplo: alfa e beta-xilosidases, alfa-fucosidase, beta-glicosidase, beta-manosidase entre outras.

Todos os genes que participam dos processos de degradação de ácidos graxos (beta-oxidação) foram encontrados (**anexo 7**), com base nos dados descritos em outros organismos utilizados como padrão de comparação, como por exemplo *E. coli*. O mesmo se procede com os genes responsáveis pela degradação de pequenas moléculas, muitas delas subprodutos de degradação de compostos mais complexos, como é o caso do protocatecuato, proveniente da degradação de estrutura celular vegetal.

4.2.2 – Metabolismo central

Todas as vias pertencentes a esta subcategoria estão completas:

- Gliconeogênese (**frutose 1,6 bifosfatase** – EC 3.1.3.11; **NADP dependente de enzima málica** – EC 1.1.1.40; e **fosfoenolpiruvato sintase** – EC 2.7.9.2 - ver anexo 2);
- Via das pentoses – fase não oxidativa (**D-ribulose-5-fosfato 3-epimerase** – EC 5.1.3.1; **ribose-5-fosfato isomerase A** - EC 5.3.1.6; **transaldolase B** - EC 2.2.1.2; e **transcetolase 1** – EC 2.2.1.1 – ver anexo 5);
- Metabolismo de enxofre (detalhado mais adiante);
- Via do glioxilato (**isocitrato liase** – EC 4.1.3.1 e **malato sintase** – EC 4.1.3.2 – ver anexo 4);
- Entner-Doudoroff (**6-fosfogluconato desidratase** – EC 4.2.1.12; e **KDPG aldolase** - EC 4.1.3.14 e **KHG aldolase** – EC 4.1.3.14: enzimas chave para ativação desta via).
- Além de inúmeras enzimas relacionadas com hidrólise e interconversão de nucleotídeos e degradação de compostos fosfatados,

4.2.3 – Metabolismo energético

Xanthomonas possui as vias desta subcategoria completa: glicólise (**anexo 2**), ciclo de Krebs (TCA) (**anexo 3**), complexo piruvato desidrogenase e metabolismo de piruvato (**anexo 11**), via das pentoses (**anexo 5**), respiração anaeróbica e fosforilação oxidativa (**anexo 9**) e complexo ATP sintase (**anexo 10**).

Com base no estudo detalhado de cada uma destas vias, descritas com maiores detalhes nos anexos correspondentes, desenhamos o que seria o metaboloma de *Xanthomonas citri* para as vias de metabolismo energético. Como este metabolismo relaciona-se diretamente com outros processos celulares, como por exemplo biossíntese e degradação de aminoácidos, síntese e utilização de compostos precursores de parede celular, vias de utilização de nicotinamida e biossíntese de nucleotídeos, tivemos que fazer uma apanhado geral para apresentar esta inter relação entre eles.

O resultado apresenta-se detalhado na figura 12. Cada via é representada de uma cor (ver legenda abaixo), onde as setas indicam o direcionamento das reações; setas pontilhadas representam vias incompletas, pela ausência de enzimas consideradas chave; as estruturas ovais compreendem os RNAt (transportadores) e as setas azuis representam os subprodutos de excreção, que podem se relacionar com controle de estresse osmótico (Graham, J. E. and Wilkinson, B. J., 1992).

Figura 12 – Metaboloma de *Xanthomonas citri* desenhado com base nos dados de anotação. Observa-se que todas as vias relacionadas com o metabolismo energético e de pequenas moléculas apresentam-se completas (ver legenda abaixo). Cada uma das vias citadas na legenda apresenta-se detalhada nos seus respectivos anexos.

Legenda:

- Azul – glicólise e gliconeogénese;
- Salmão – ciclo de Krebs (TCA) e via do glioxilato;
- Verde – biossíntese e degradação de ácidos graxos;
- Rosa – transporte de elétrons e fosforilação oxidativa;
- Vinho – complexo ATP sintase;
- Azul claro – ciclo da uréia;
- Laranja – metabolismo de enxofre;
- Amarelo – aminoácidos;

4.2.4 – Genes de funções regulatórias

Xanthomonas possui 29 duplos componentes regulatórios (sensor e regulador), sendo que alguns apresentam similaridade com genes que possuem funções bem definidas, como é o caso:

- *NodVW* (SP-P15939) - relacionados com a regulação dos genes de nodulação, e *NtrBC* (SP-P45670) – relacionados com ativação dos genes de assimilação de nitrogênio;
Apesar de serem encontrados os duplos componentes regulatórios para as funções de nodulação e assimilação de nitrogênio, *Xanthomonas* não possui os genes que codificam as proteínas para estas funções.
- *RegSR* - relacionados com a expressão de genes envolvidos no processo de respiração anaeróbica;
- *CreCB* (SP-P08368) - envolvidos com regulação catabólica;
- *PilSR* (SP-P33639) – envolvidos na regulação da expressão de genes de fimbria tipo IV;
- *TctDE* (SP-P22104) - regulação da ativação do *operon* de transporte de ácidos tricarbóxicos;
- *PhoQP* (SP-P23837) – envolvidos com a regulação da fosfatase ácida;
- *PhoBR* (SP-P08402) – relacionados com a expressão de *regulons* relacionados com metabolismo e utilização de grupos fosfato;

Além destes citados acima, há aqueles que apresentam-se como duplos componentes regulatórios, pelo grau de conservação de seus resíduos e por apresentarem-se em *tandem* (sensor/regulador), mas que não tiveram uma função putativa determinada.

Possui também uma extensa gama de repressores e ativadores de transcrição, com 164 prováveis genes, onde 115 (70%) foram classificados como reguladores de transcrição de diferentes famílias (*LysR* (SP-P03030), *LacI* (SP-Q01936), *LuxR* (SP-P35327), *GntR* (SP-P46833), *AraC* (SP-P11765), *TetR* (SP-P03038), entre outros).

De um total de 32 genes classificados como quinases e fosfatases, 13 (40%), apresentam características de proteínas híbridas com dois domínios: um de resposta e regulação e um de fosforilação (histidina quinase); e 4 foram classificados como serina treonina quinases.

Xanthomonas ainda possui 31 genes relacionados com fatores sigma e outros componentes regulatórios não classificados nas categorias acima.

4.3 – Análise da organização estrutural dos genes nos genomas dos fitopatógenos *Xanthomonas citri* e *Xylella fastidiosa*

Utilizando os programas de comparação de genomas completos, feitos pelos doutores Nalvo Almeida Júnior - UFMS e João Carlos Setubal - UNICAMP (membros da equipe de seqüenciamento e anotação do genoma de *Xanthomonas*), fomos capazes de comparar as regiões dos genomas de *Xanthomonas* (Xac) e *Xylella* (Xf) que apresentavam as mesmas organizações gênicas, classificadas como **runs** (ver descrição nas metodologias). Desta comparação obtivemos como resultado final um total de 143 **runs**, categorizados da seguinte forma:

- 65 **runs** foram encontrados apenas nos fitopatógenos Xf, Xac e Xcc (*Xanthomonas campestris*), sendo que 27 destes, apresentavam uma composição de no mínimo 6 CDS's;
- 73 **runs** foram encontrados em Xf, Xac e em outros organismos, dentre os descritos na lista de genomas inclusos nesta análise (ver tabela 2);
- 4 **runs** foram classificados como exclusivos de Xf e Xac, sendo que um deles na realidade é compostos por apenas 2 CDS's (ver detalhes adiante);
- 1 **run** apresenta-se como exclusivo de Xf e Xac, mas parte dele também foi encontrado em *Salmonella typhimurium*, apresentando-se como misto ou quimérico.

Uma representação da distribuição dos **runs** entre os genomas de *Xylella* e *Xanthomonas* pode ser visualizada na figura 13. Utilizando-se este mesmo modelo, fizemos uma comparação do genoma de *Xanthomonas* à outros três organismos (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae*), na tentativa de termos uma noção de quais regiões apresentavam a mesma organização em outras bactérias (ver figura 14). Durante estas análises, também classificamos os **runs** supracitados como envolvidos ou não no processo de virulência e patogenicidade, e se os mesmos apresentam-se em uma disposição paralela ou antiparalela (ver metodologias). Nesta análise observamos que *Xanthomonas* apresenta um maior número de **runs** compartilhados com *Xylella* do que com as demais bactérias, o que condiz com suas taxonomias.

Figura 13 – Análise comparativa entre os *runs* de *Xanthomonas citri* (Xac) e *Xylella fastidiosa* (Xf), com base nos resultados gerados a partir do programa criado pelos doutores Nalvo e Setubal. As cores indicadas em cada *run* representam: **azul** – sem características de patogenicidade ou virulência e organizadas de forma paralela; **verde** – idem azul, porém em organização antiparalela; **rosa** – com características de patogenicidade ou virulência e organizadas de forma paralela; **vermelho** – idem rosa, porém em organização antiparalela. Para maiores informações acompanhar o texto.

Figura 14 – Análise comparativa entre os *runs* de *Xanthomonas citri* versus *Xylella fastidiosa*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae*, com base nos resultados gerados a partir do programa criado pelos doutores Nalvo e Setubal. A referência de cores está descrita na figura anterior (13). Maiores informações ver o texto.

4.3.1 – Análise dos *runs* exclusivos de Xf e Xac

Apenas 4 *runs* (nomeados de A à D), apresentaram-se como sendo exclusivos de *Xylella* e *Xanthomonas*, e 1 *run* parcialmente presente no genoma de *Salmonella typhimurium* (misto). A descrição detalhada de cada um deles apresenta-se abaixo, acompanhada de uma figura e uma tabela comparativa:

Run A – Apresenta um tamanho médio de 6 kb em ambas as bactérias e é inteiramente relacionado com a biossíntese de fimbrias. *Xanthomonas* possui estes genes flanqueados por um *cluster* de proteínas de fago (ver figura 15.1). A função deste *run* pode estar relacionada ao fato de serem bactérias produtoras de biofilme, e em *Xylella* a sua existência condiz ainda mais com o fato de ser um recurso indispensável para que a bactéria possa sobreviver no xilema e ser transportada pelo vetor “cigarrinha” (detalhes ver pili e fimbrias 4.4.9).

Figura 15.1

>XF0028 5 matches

6kb in Xf - 6kb in Xi

Gene (Xf)	gi	size	product
+XF0028	9104792	187aa	pre-pilin like leader sequence
+XF0029	9104793	158aa	pre-pilin leader sequence
+XF0030	9104794	316aa	hypothetical protein
+XF0031	9104795	195aa	PilX protein
+XF0032	9104796	1230aa	PilY1 gene product
+XF0033	9104797	139aa	PilE protein

Gene (Xi)	gi	size	product
-XAC2664	21243393	143aa	PilE protein
-XAC2665	21243394	1115aa	PilY1 protein
-XAC2666	21243395	184aa	PilX protein
-XAC2667	21243396	341aa	conserved hypothetical protein
-XAC2668	21243397	155aa	pre-pilin leader sequence
-XAC2669	21243398	190aa	pre-pilin like leader sequence

matches

Gene	start	size	e-value	[best hit]	product
+XF0033	30298	139	1e-25	[best	] PilE protein
-XAC2664	3121305	143	6e-26	[best	] PilE protein
+XF0031	25992	195	5e-22	[best	] PilX protein
-XAC2666	3125099	184	2e-22	[best	] PilX protein
+XF0030	25045	316	4e-58	[best	] hypothetical protein
-XAC2667	3125650	341	2e-58	[best	] conserved hypothetical protein
+XF0029	24572	158	8e-37	[best	] pre-pilin leader sequence
-XAC2668	3126672	155	4e-37	[best	] pre-pilin leader sequence
+XF0028	23999	187	3e-43	[best	] pre-pilin like leader sequence
-XAC2669	3127151	190	1e-43	[best	] pre-pilin like leader sequence

Run B – Apresenta um tamanho médio de 1 kb em ambas as bactérias, sendo formado por duas CDS's com mesma função, caracterizado por um provável evento de duplicação gênica. A similaridade é tão grande entre estas CDS's que poderíamos classificar qualquer uma delas como sendo BBH quando comparadas entre si (ver linhas vermelhas). Na realidade este exemplo foge das linhas gerais e parâmetros definidos como fundamentais para a obtenção dos resultados pelo programa gerado, mas como apresentam a mesma função do exemplo A (biossíntese de fimbrias), citado anteriormente, achamos por bem classificá-lo como um *run* exclusivo.

Em ambas as bactérias estes genes encontram-se próximos de regiões instáveis do genoma (seqüências de fagos ou elementos de transposição). Estes dois genes em *Xylella* apresentam-se entre as CDS's Xf0459 e Xf0575. Uma região de aproximadamente 91.2 kb com um total de 116 prováveis produtos gênicos, onde apenas 17 (14.6%) foram classificadas com alguma função putativa (ver detalhes desta região na figura 41B). A análise das seqüências de um grande número destes genes hipotéticos, revelaram que os mesmos são bastantes similares à regiões de fagos, demonstrando que esta região parece compreender resíduos da inserção de um fago, e que vem se perdendo no decorrer da evolução e adaptação bacteriana (Ogata, H. et al. 2001) (ver figura 15.2).

Figura 15.2

>XF0538-34-Rc4 matches

1kb in Xf - 1kb in Xi

Gene (Xf) gi size product

~XF0538 9105395 186aa fimbrillin
~XF0539 9105396 187aa fimbrillin

Gene (Xi) gi size product

~XAC3240 21243966 146aa fimbrillin
~XAC3241 21243967 146aa fimbrillin

matches

Gene start size e-value [best hit] product

~XF0539 531197 187 2e-18 [best] fimbrillin
~XAC3241 3819610 146 5e-19 [+XF2542 /2e-30] fimbrillin

~XF0539 531197 187 3e-14 [-XAC3241 /2e-18] fimbrillin
~XAC3240 3819045 146 9e-15 [+XF2542 /5e-28] fimbrillin

~XF0538 530636 186 4e-20 [-XAC3240 /2e-20] fimbrillin
~XAC3241 3819610 146 1e-20 [+XF2542 /2e-30] fimbrillin

~XF0538 530636 186 2e-20 [best] fimbrillin
~XAC3240 3819045 146 7e-21 [+XF2542 /5e-28] fimbrillin

Run C - Apresenta um tamanho médio de 7 kb em *Xylella* e 11 kb em *Xanthomonas*, tendo CDS's com as seguintes funções: *dihydrolipoamide dehydrogenase* e *dihydrolipoamide acetyltransferase* relacionados com a conversão de alfa cetoácidos em acetil coA + CO₂ (SPQ9Z773 – Swiss-prot); **proteínas de membrana externa e ABC transportadores** envolvidos com o transporte de solutos através da membrana citoplasmática e pertencem a um grupo de proteínas que podem estar envolvidos com a determinação antigênica e virulência bacteriana (Protein family: PF0497-SBP_bac_3). Em *Xanthomonas* este **run** localiza-se em uma das pontas da segunda inversão com translocação mais próxima dos *operons* ribossomais (em relação ao genoma de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) (ver figura 15.3).

Figura 15.3

>XF0875-50-Rc6 matches

7kb in Xf - 11kb in Xi

Gene (Xf)	gi	size	product
-XF0868	9105778	603aa	dihydrolipoamide dehydrogenase
-XF0869	9105779	551aa	dihydrolipoamide acetyltransferase
+XF0871	9105781	74aa	hypothetical protein
+XF0872	9105784	181aa	outer membrane protein
-XF0873	9105785	261aa	outer membrane protein
-XF0874	9105786	235aa	ABC transporter permease protein
-XF0875	9105787	334aa	ABC transporter ATP-binding protein

Gene (Xi)	gi	size	product
-XAC3659	21244384	607aa	dihydrolipoamide dehydrogenase
-XAC3660	21244385	215aa	conserved hypothetical protein
-XAC3661	21244386	592aa	dihydrolipoamide acetyltransferase
-XAC3662	21244387	246aa	conserved hypothetical protein
-XAC3663	21244388	173aa	conserved hypothetical protein
+XAC3664	21244389	228aa	outer membrane protein
-XAC3665	21244390	169aa	conserved hypothetical protein
+XAC3666	21244391	220aa	hypothetical protein
-XAC3667	21244392	269aa	outer membrane protein
-XAC3668	21244393	231aa	ABC transporter permease
-XAC3669	21244394	335aa	ABC transporter ATP-binding protein

matches

Gene	start	size	e-value	[best hit]	product
-XF0875	833828	334	1e-144	[best	] ABC transporter ATP-binding protein
-XAC3669	4346812	335	1e-144	[best	] ABC transporter ATP-binding protein
-XF0874	833124	235	7e-98	[best	] ABC transporter permease protein
-XAC3668	4346120	231	3e-98	[best	] ABC transporter permease
-XF0873	832245	261	1e-110	[best	] outer membrane protein
-XAC3667	4345165	269	1e-110	[best	] outer membrane protein
+XF0872	831594	181	2e-39	[best	] outer membrane protein
+XAC3664	4342359	228	1e-39	[best	] outer membrane protein
-XF0869	828949	551	0	[best	] dihydrolipoamide acetyltransferase
-XAC3661	4338761	592	0	[best	] dihydrolipoamide acetyltransferase
-XF0868	827092	603	0	[best	] dihydrolipoamide dehydrogenase
-XAC3659	4336277	607	0	[best	] dihydrolipoamide dehydrogenase

Run D – Apresenta um tamanho médio de 3 kb em ambas as bactérias e não apresentam nenhuma característica funcional peculiar pelo fato de ser composta inteiramente por genes hipotéticos (ver figura 15.4). No entanto, em *Xanthomonas* este **run** está inserido dentro da região de inversão (quando comparada com *Xanthomonas campestris* (da Silva, et al. (2002)) no término de replicação. Nesta mesma região, 8.78 kb *downstream* deste **run** em *Xylella*, e 20.5 kb do mesmo **run** em *Xanthomonas*, encontramos um outro grupo de seqüências que além de serem exclusivas destas duas bactérias, apresentaram parcial similaridade com um **run** de *Salmonella typhimurium* (circundado pelo quadrado da figura), classificado como um **run** quimérico ou misto.

Figura 15.4

>XF1020715-98-Ac 5 matches

3kb in Xf - 3kb in Xi

Gene (Xf) gi size product

-XF1757	9106829	86aa	hypothetical protein
-XF1758	9106830	135aa	hypothetical protein
-XF1759	9106831	107aa	conserved plasmid protein
-XF1760	9106832	220aa	hypothetical protein
-XF1761	9106833	375aa	hypothetical protein

Gene (Xi) gi size product

+XAC2236	21242971	407aa	conserved hypothetical protein
+XAC2237	21242972	233aa	conserved hypothetical protein
+XAC2238	21242973	114aa	plasmid-related protein
+XAC2239	21242974	135aa	conserved hypothetical protein
+XAC2240	21242975	86aa	conserved hypothetical protein

matches

Gene	start	size	e-value	[best hit]	product
-XF1761	1677741	375	1e-128	[best	] hypothetical protein
+XAC2236	2619587	407	1e-128	[best	] conserved hypothetical protein
-XF1760	1677021	220	5e-87	[best	] hypothetical protein
+XAC2237	2620870	233	3e-87	[best	] conserved hypothetical protein
-XF1759	1676603	107	7e-37	[best	] conserved plasmid protein
+XAC2238	2621664	114	4e-37	[best	] plasmid-related protein
-XF1758	1676095	135	2e-65	[best	] hypothetical protein
+XAC2239	2622116	135	8e-66	[best	] conserved hypothetical protein
-XF1757	1675818	86	4e-33	[best	] hypothetical protein
+XAC2240	2622538	86	2e-33	[best	] conserved hypothetical protein

Além dos *runs* exclusivos entre estas duas bactérias, verificamos também que, do total de CDS's de cada organismo, **1526** foram classificadas como sendo BBH entre *Xylella* e *Xanthomonas*. Ou seja, ao analisarmos as seqüências destas CDS's de *Xanthomonas* contra o banco de genes, o organismo que apresentou a melhor similaridade foi *Xylella*, e vice versa. Portanto, poderíamos afirmar que aproximadamente 35% do genoma de *Xanthomonas* é mais similar ao genoma de *Xylella* do que em relação a qualquer outro organismo, que não seja uma Xanthomoneacea. Bem como, cerca de 58,6 % do genoma de *Xylella* é mais similar ao genoma de *Xanthomonas* do que em relação a qualquer outro organismo. Este número só é inferior a uma comparação e análise de BBH's entre as duas *Xanthomonas*, *citri* e *campestris* (da Silva, et al. (2002)).

Dentre este grupo de CDS's, 46 são exclusivas destes fitopatógenos, ou seja, só são encontradas, pelo menos até o momento, em *Xanthomonas* e *Xylella*. Segue abaixo as descrições de cada uma delas, quanto ao seu posicionamento nos genomas, associados a uma tabela descritiva de identificação (subdivisões da tabela 4):

- 15 genes de *Xanthomonas* apresentam-se dispersos nos plasmídeos pXac65 (a) e pXac33 (b), sendo 3 deles relacionados com os genes *Vir*. Destes 15, 13 também apresentam-se no plasmídeo pXf51 de *Xylella* (ver tabela 4.1) e os outros dois inseridos no genoma (ver detalhes em azul na tabela);

Xac_gene	Produto	Xf_gene
XACa0001	conserved hypothetical protein	XFa0064
XACa0014	conserved hypothetical protein	XFa0050
XACa0015	conserved hypothetical protein	XFa0050
XACa0036	conserved hypothetical protein	XFa0022
XACa0037	conserved hypothetical protein	XFa0023
XACb0022	conserved hypothetical protein	XFa0050
XACb0023	conserved hypothetical protein	XFa0050
XACb0032	conserved hypothetical protein	XF1862
XACb0033	conserved hypothetical protein	XF1863
XACb0040	VirB8 protein	XFa0012
XACb0041	VirB6 protein	XFa0011
XACb0044	VirB5 protein	XFa0008
XACb0059	virulence associated protein	XF1589
XACb0069	conserved hypothetical protein	XFa0022
XACb0070	conserved hypothetical protein	XFa0023

Tabela 4.1

- 14 apresentam-se dispersas dentro da região que corresponde um inversão (quando comparada com *Xanthomonas campestris* (da Silva, et al. (2002))), encontrada no término de replicação de *Xanthomonas*, e que apresenta uma organização muito parecida no genoma de *Xylella*. Estes

genes coincidem com dois *runs* já citados anteriormente e descrito como exclusivos destas bactérias (**D** - ver figura 15.4). Na realidade um destes *runs* apresenta-se como um mosaico em *Xanthomonas citri*, sendo parte dele encontrado também no genoma de *Salmonella typhimurium* (ver tabela 4.2).

Xac_gene	Produto	Xf_gene
XAC2204	phage-related protein	XF1786
XAC2207	conserved hypothetical protein	XF1782
XAC2208	conserved hypothetical protein	XF1781
XAC2209	conserved hypothetical protein	XF1780
XAC2210	conserved hypothetical protein	XF1779
XAC2211	single-stranded DNA binding protein	XF1778
XAC2213	cytosine-specific DNA methyltransferase	XF1774
XAC2217	conserved hypothetical protein	XF1772
XAC2218	conserved hypothetical protein	XF1771
XAC2221	conserved hypothetical protein	XF1769
XAC2237	conserved hypothetical protein	XF1760
XAC2238	plasmid-related protein	XF1759
XAC2239	conserved hypothetical protein	XF1758
XAC2240	conserved hypothetical protein	XF1757

Tabela 4.2

- 3 genes de *Xanthomonas* (Xac1025/26/27) na realidade compreendem um único gene de *Xylella fastidiosa*, mostrando que são comuns eventos de fragmentação gênica (*split*), por mudança no canal de leitura e tradução das proteínas, que podem, no decorrer da evolução, promoverem a perda definitiva destes genes pela bactéria (Ogata, H. et al. 2001) (ver tabela 4.3). Um outro evento similar a este pode ser visualizado na provável CDS que codifica para o gene *RcsC* (sensor de um duplo componente regulatório) descrito com mais detalhes no tópico 4.4.5.3). Os outros dois genes detalhados em azul na tabela 4.3 dão similaridade com os dois genes em *tandem* localizados no cromossomo de *Xylella* (já citados na tabela 4.1 em azul).

Xac_gene	Produto	Xf_gene
XAC1025	conserved hypothetical protein	XF1887
XAC1026	conserved hypothetical protein	XF1887
XAC1027	conserved hypothetical protein	XF1887
XACb0032	conserved hypothetical protein	XF1862
XACb0033	conserved hypothetical protein	XF1863

Tabela 4.3

É interessante observar que os genes citados na tabela 4.3 flanqueiam uma região de duplicação e inversão do genoma de *Xylella*, caracterizada por inúmeras CDS's que codificam genes hipotéticos (figura 16).

Figura 16

- CDS Xac0858 – Xf0874 (*ABC transporter permease*), apresenta-se inserida dentro de uma dos *runs* exclusivos destas bactérias (ver figura 15.3);
- CDS Xac2899 – Xf2722 – compreende uma enzima relacionada com o sistema de restrição (*type I restriction modification system specificity determinant*);
- CDS Xac1812 – Xf1469 (*HmsF protein*) e Xac2011 – Xf1454 (*conserved hypothetical protein*) flanqueiam a região onde provavelmente existia o segundo *cluster* do sistema secretório tipo II de *Xylella fastidiosa* (ver figura 17 e descrição detalhada deste sistema no tópico 4.4.6)

Figura 17

- O restante não apresenta nenhuma característica peculiar que possa ser descrita (ver tabela 4.4)

Xac_gene	Produto	Xf_gene
XAC0332	conserved hypothetical protein	XF2273
XAC0815	methyltransferase	XF2471
XAC1169	hypothetical protein	XF2739
XAC1959	conserved hypothetical protein	XF0486
XAC2429	conserved hypothetical protein	XF2075
XAC3674	conserved hypothetical protein	XF0992
XAC3770	conserved hypothetical protein	XF1132
XAC4125	conserved hypothetical protein	XF2169
XAC4314	plasmid stability protein	XF1590
XAC4315	plasmid stability protein	XF1589

Tabela 4.4

4.4 – Análise comparativa entre *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri*

A análise comparativa do genoma de *Xanthomonas* em relação ao genoma de *Xylella* deu-se por vários aspectos, entre os quais: o fato de ambas pertencerem a um mesmo grupo; por serem patógenos de um mesmo hospedeiro (citros); e por alojarem-se em ambientes diferentes.

Uma macro análise entre as duas bactérias mostrou que *Xanthomonas* possui o dobro do tamanho genômico de *Xylella*, o mesmo pode ser observado em uma relação diretamente proporcional ao número de CDS's encontradas, independentemente de sua função pré-definida. *Xanthomonas* apresenta aproximadamente 4432 CDS's, enquanto *Xylella* apresenta 2838. Ambas possuem dois plasmídeos, que se diferem quanto ao número e organização de CDS's (ver figura 18). Em *Xanthomonas* os plasmídeos contém 65 e 33 kb respectivamente (pXac65 e pXac33), em *Xylella* os plasmídeos também apresentam-se menores, 51 e 1.3 kb (pXf51 e pXf1.3). A composição de CG de *Xanthomonas* gira em torno de 65 % do genoma, enquanto que em *Xylella* este número cai para 50%.

Figura 18 - Macro comparação entre os genomas de *Xylella fastidiosa* (esquerda) e *Xanthomonas citri* (direita). Nos cantos superiores encontram-se as fotos de microscopia eletrônica de ambas as bactérias em seus ambientes de vida. Repare que *Xanthomonas* é monotríquia (possui um flagelo polar).

Toda esta comparação, nos forneceu a idéia de que *Xanthomonas citri* apresenta uma maior complexidade de vias metabólicas não descritas em *Xylella fastidiosa*. A tabela 5 apresenta o resultado completo da comparação entre tais vias, tendo como base as categorias descritas no genoma de *E. coli* (Blattner, F. R., 1997).

Categorias	<i>Xanthomonas citri</i>	%	<i>Xylella fastidiosa</i>	%	Xac-Xf
I – Metabolismo Intermediário	720	16.5	226	8	494
II – Biossíntese de Pequenas Moléculas	353	8.2	216	7.6	137
III – Metabolismo de Macromoléculas	497	11.4	356	12.5	141
IV – Estrutura Celular	223	5.2	128	4.5	95
V – Processos Celulares	359	8.3	118	4.2	241
VI – Elementos Genéticos Móveis	146	3.4	135	4.7	11
VII – Patogenicidade, Virulência e Adaptação	293	6.8	128	4.5	165
VIII - Hipotéticas	1636	37.8	1517	53	119
IX - CDS's com categoria indefinida	105	2.4	24	1	81
Total	4332	100	2848	100	1584

Tabela 5: Classificação das CDS's encontradas em *Xanthomonas citri* e *Xylella fastidiosa* de acordo com sua função putativa pré-determinada (Blattner, F. R., 1997). Observa-se que em todas as categorias, o número de CDS's é superior em *Xanthomonas citri*, isto está diretamente associado ao tamanho de seu genoma. Na categoria I, a diferença é ainda maior, isto se dá pela presença de um grande número de genes envolvidos na degradação de parede celular, vias de metabolismo energético e genes de funções regulatórias, não encontrados no genoma de *Xylella fastidiosa* (Simpson, A.J.G. et al., 2000). Maiores detalhes serão abordados adiante.

Tendo em vista a diferença observada nos valores correspondentes à categoria I, verificamos que *Xanthomonas citri* apresenta um grande número de enzimas que participam da degradação de açúcares complexos, portanto podem estar relacionadas com patogenicidade e virulência (ver figura 19). Destaque para as enzimas de degradação de xilano (composto fundamental que participa da composição da parede celulósica), tais como xilanases (EC 3.2.1.8) e xilosidases/arabinosidases (EC 3.2.1.37), além de 7 cópias de celulase (EC 3.2.1.4), que apesar de não estarem descritas na tabela, também encontram-se no genoma de *Xanthomonas citri*.

Poderíamos assumir que estas enzimas estariam ligadas à possibilidade que a bactéria tem de degradar a parede celulósica, facilitando sua transferência ao interior do vegetal. Em *Xylella fastidiosa*, observa-se que o número destas enzimas com função de degradação de parede é limitado, o que de certa forma condiz com o fato de ser transportada mediante auxílio de um vetor, a cigarrinha. Portanto, *Xylella fastidiosa* não necessita, pelo menos em primeira instância, de uma maquinaria tão complexa de degradação de celulose, diferentemente de *Xanthomonas citri* que se aproveita de pequenas lesões na epiderme do vegetal para infectá-lo.

Figura 19 – Histograma representando as divergências entre as subcategorias I.A (Metabolismo Intermediário - Degradação) de *Xylella fastidiosa* (Xf) e *Xanthomonas citri* (Xac). Em *Xylella* todas as CDS's com esta função estavam inseridas dentro da categoria I.A.2 (degradação de pequenas moléculas). Já em *Xanthomonas* os genes para esta função foram subdivididas em três classes: I.A.1 (degradação de polissacarídeos), I.A.2 e I.A.3 (degradação de lipídeos). Detalhes da categoria I.A.1 estão representados na tabela ao lado. Observa-se que *Xanthomonas* apresenta uma rica maquinaria de degradação de parede celular não encontrada em *Xylella*.

Outra subcategoria que nos chamou a atenção foi a de funções regulatórias. *Xanthomonas* possui quase 4 vezes mais genes que *Xylella*. Em *Xanthomonas* classificamos estes genes em 4 subgrupos: I.D.1 (sistemas de duplos componentes regulatórios - 69), I.D.2 (ativadores e repressores - 164), I.D.3 (quinases e fosfatases - 32) e I.D.4 (fatores sigma e outros componentes regulatórios - 31). Este maior número de genes com funções regulatórias pode estar relacionado com uma maior complexidade metabólica observada em *Xanthomonas citri*.

4.4.1 - Metabolismo energético

Xanthomonas citri apresenta um metabolismo energético completo, quando comparado com *Xylella fastidiosa* (ver tabela 6 e comparar as imagens da figura 20), com **via glicolítica e gliconeogênese** – anexo 2, **ciclo de Krebs (TCA)** – anexo 3, **via do glioxilato** – anexo 4, **via das pentoses fosfato** (oxidativa e não oxidativa) – anexo 5, **biossíntese de ácidos graxos** - anexo 6, e **degradação de ácidos graxos** (Beta oxidação) – anexo 7, completos.

Vias	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Xanthomonas citri</i>
Glicólise	Completa	Completa
Gluconeogênese	Incompleta	Completa
Ciclo de Krebs (TCA)	Completa	Completa
Via do Glioxilato	Ausente	Completa
Pentose fosfato	Incompleta	Completa
Biossíntese de ácidos graxos	Completa	Completa
Beta oxidação	Ausente	Completa

Tabela 6: Principais vias e composição do metabolismo energético das bactérias *Xylella fastidiosa* e *Xanthomonas citri*.

Em *Xylella* isso não ocorre. Ausentam-se as CDS's que codificam para as enzimas frutose-1,6-bifosfatase (EC 3.1.3.11) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (EC 4.1.1.32) relacionadas com a gliconeogênese; malato sintase (EC 4.1.3.2) e isocitrato liase (EC 4.1.3.1) relacionadas com a via do glioxilato; glicose-1-desidrogenase (EC 1.1.1.47), gluconolactoquinase (EC 3.1.1.17), gluconoquinase (EC 2.7.1.12), fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44) e transaldolase B (EC 2.2.1.2) relacionadas com a via das pentoses fosfato. Além disso observa-se a ausência total das enzimas relacionadas ao processo de beta oxidação, presentes em *Xanthomonas*. A fosforilação oxidativa das duas bactérias também apresentam-se divergentes. *Xanthomonas* dispõe de dois sistemas relacionados ao complexo citocromo C oxidase. O primeiro, e clássico sistema, é formado pelas subunidades codificadas pelos genes *CyoABCDE* (bo3) também presentes em *Xylella*. O segundo sistema é formado por dois genes *CydAB*, que compõe o complexo bd. Segundo Gennis, R. B. and Stewart, V. 1996, este complexo em *E.coli* seria sintetizado em ambientes que apresentassem baixas condições de aeração. Em *Xylella* o complexo bd não está presente. O complexo citocromo c oxidase tipo bb3 está ausente em ambas as bactérias, *Xylella* e *Xanthomonas*.

Estas diferenças observadas, poderia favorecer *Xanthomonas* no processo conhecido como modularidade dos componentes respiratórios, por possibilitar o uso de seus sistemas respiratórios em diferentes condições de crescimento (detalhes dos sistemas ver anexo 11).

Uma análise comparativa envolvendo outros organismos, no que diz respeito à presença de diferentes complexos citocromo C oxidase (bo3, cbb3 ou bd) foi feita, e o que pôde-se verificar é que há uma grande divergência entre estruturação e composição destes complexos. No entanto observa-se que *Xylella* é o único organismo a possuir apenas um deles (bo3), e é o único organismo que não possui complexo bd (ver tabela 7).

Complexos Citocromo C oxidase	Organismos								
bo3	Xf	Cc	Pa	Ec	Bs	Vc	Hi	Mt	Xac
CyoE			X	X	X			X	
CyoD	X		X	X	X				X
CyoC	X		X	X	X			X	X
CyoB	X		X	X	X			X	X
CyoA	X		X	X	X			X	X
cbb3	Xf	Cc	Pa	Ec	Bs	Vc	Hi	Mt	Xac
I		X	X			X			
II		X	X			X			
III		X	X			X			
IV						X			
bd	Xf	Cc	Pa	Ec	Bs	Vc	Hi	Mt	Xac
CydA		X	X	X	X	X	X	X	X
CydB		X	X	X	X	X	X	X	X

Tabela 7: Composição do complexo citocromo C oxidase em 9 organismos diferentes. As CDS's existentes em cada um deles são assinaladas com um **X**. Xf é o único dos organismos citados a não apresentar o complexo bd. Ps, Cc e Vc são os únicos a apresentarem o complexo cbb3. Xf *Xylella fastidiosa*; Cc *Caulobacter crescentus*; Pa *Pseudomonas aeruginosa*; Ec *Escherichia coli*; Bs *Bacillus subtilis*; Vc *Vibrio cholerae*; Hi *Haemophilus influenzae*; Mt *Mycobacterium tuberculosis* e Xac *Xanthomonas citri*.

Para se ter uma visão global do metabolismo energético comparativo entre estes dois patógenos, utilizamos o metaboloma de *Xanthomonas* como referência e criamos, à partir do genoma de *Xylella* (Simpson, A.J.G. et al., 2000), o seu metaboloma. Resultado, todas as divergências citadas até o momento, podem ser visualizadas na comparação destas duas imagens (ver figura 20):

- Gliconeogênese – ausente em *Xylella*;
- Via das Pentoses – incompleta em *Xylella*;
- Via do glioxilato – ausente em *Xylella*;
- β oxidação – ausente em *Xylella*;
- Complexo citocromo c oxidase bd – ausente em *Xylella*;

Ver legenda a seguir

Figura 20 – Metabolismo energético comparativo entre os metabolomas de *Xanthomonas citri* (acima) e *Xylella fastidiosa*. Observa-se que *Xanthomonas citri* apresenta a via de gliconeogênese incompleta, o que não pode ser visto em *Xylella*. O mesmo se procede com a via das pentoses. Além disso, em *Xylella* ausentam-se os genes que compreendem a via do glioxilato, beta oxidação, complexo citocromo c oxidase tipo bd, e genes que controlam estresse osmótico a partir dos compostos taurina e betaina.

Legenda:

Azul – glicólise e gliconeogênese; **Salmão** – ciclo de Krebs (TCA) e via do glioxilato; **Verde** – biossíntese e degradação de ácidos graxos; **Rosa** – transporte de elétrons e fosforilação oxidativa; **Vinho** – complexo ATP sintase; **Azul claro** - ciclo da uréia; **Laranja** – metabolismo de enxofre; **Amarelo** – aminoácidos; **Branco** – representam outros compostos essenciais para as conversões; **Setas** indicam o direcionamento da reação; **Pontilhadas** representam vias incompletas; desenhos em duas cores representam complexos ausentes; símbolos ovais vermelhos representam os RNAt.

4.4.2 - Metabolismo de aminoácidos

Quanto ao metabolismo de aminoácidos não observa-se grandes divergências. Os *operons* de biossíntese de histidina e treonina, prolina e arginina, triptofano e leucina em ambas as bactérias apresentam-se com mesma organização, com uma pequena diferença no *operon* de biossíntese de prolina e arginina dado pela presença do gene *ArgA* (“*amino-acid acetyltransferase*”), ausente em *Xylella* (detalhes descritos adiante). No entanto, em *Xanthomonas* observa-se um maior número de CDS's que estariam relacionadas à degradação de lignina na formação de compostos secundários como vanilato, protocatecuato e oxoadipato (Masal, E et al.. 2000 e Hara, H. et al.. 2000). Compostos estes que poderiam caracterizar sua adaptação no mesófilo foliar e que acabariam sendo reutilizados como substratos para a biossíntese de aminoácidos aromáticos via catálise enzimática. As vias de conversão e degradação destes produtos descritas nos trabalhos de Masal e Hara apresentam-se incompletas em *Xanthomonas citri*, com ausência de enzimas vitais, mesmo assim, observa-se que *Xylella fastidiosa* não possui nenhuma sequência similar às CDS's referidas para esta função (tabela 8).

CDS	Simil.	Produto	Nome do gene	Organismo com melhor similaridade	Vias
Xac1886	44 %	<i>beta-ketoadipate enol-lactone hydrolase</i>	pcaD or catD	<i>Vibrio cholerae</i>	
Xac2736	36 %	<i>carboxymethylenebutenolidase</i>		<i>Caulobacter crescentus</i>	
Xac3175	31 %	<i>4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase</i>	mphE or bphF	<i>Sphingomonas aromaticivorans</i>	
Xac0362	35 %	<i>phenoxybenzoate dioxygenase beta subunit</i>	pobB	<i>Pseudomonas sp. CA10</i>	
Xac0366	68 %	<i>beta-ketoadipyl CoA thiolase</i>	pcaF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Xac0370	54 %	<i>b-ketoadipate enol-lactone hydrolase</i>	catD	<i>Frateriuria sp. ANA-18</i>	
Xac0452	53 %	<i>4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Xac4155	75 %	<i>acyl transferase</i>	fldZ	<i>Sphingomonas sp. LB126</i>	2/1
Xac0310	52 %	<i>vanillate O-demethylase oxidoreductase</i>	vanB	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2
Xac0311	30 %	<i>vanillate O-demethylase oxygenase subunit</i>	vanA	<i>Pseudomonas sp. HR199</i>	2
Xac0878	45 %	<i>protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain</i>	pcaH	<i>Sphingomonas sp. LB126</i>	2
Xac2940	74 %	<i>benzene 1,2-dioxygenase, ferredoxin protein</i>	bedB	<i>Xylella fastidiosa</i>	2
Xac0356	68 %	<i>P-hydroxybenzoate hydroxylase</i>	pobA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2
Xac0363	46 %	<i>vanillate O-demethylase oxygenase subunit</i>	vanA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Xac0367	58 %	<i>protocatechuate 3,4-dioxygenase beta chain</i>	pcaH	<i>Burkholderia cepacia</i>	2
Xac0368	43 %	<i>protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain</i>	pcaG	<i>Sagittula stellata</i>	2
Xac0369	56 %	<i>3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase</i>	pcaB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Xac0879	29 %	<i>protocatechuate degradation protein</i>	ligA	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2/3
Xac3862	47 %	<i>chloromuconate cycloisomerase</i>	tcbD	<i>Bacillus subtilis</i>	3
Xac0371	59 %	<i>4-Carboxymuconolactone decarboxylase</i>	pcaC	<i>Pseudomonas putida</i>	3
Xac0174	63 %	<i>phenylalanine hydroxylase</i>	pah	<i>Chromobacterium violaceum</i>	3
Xac0161	47 %	<i>2-keto-4-pentenoate hydratase</i>	mhpD	<i>Caulobacter crescentus</i>	3

Tabela 8: Genes encontrados em *Xanthomonas citri* que participam do metabolismo de aminoácidos aromáticos e produtos de metabolismo secundário como vanilato, catecuato, protocatecuato e oxoadipato. As vias a que pertencem tais compostos podem ser classificadas da seguinte forma: 1 – Metabolismo de triptofano, 2 – Degradação de diclorobenzoato, 3 – metabolismo de fenilalanina; e as que não possuem vias bem definidas apresentam-se em branco.

4.4.2.1 – Organização dos *operons* relacionados com metabolismo de aminoácidos

Operons conservados, com mesma organização e relacionados com síntese e degradação de aminoácidos foram encontrados em ambas as bactérias. Estes *operons* não foram classificados como exclusivos entre as duas bactérias, pelos programas de determinação de *runs* (ver tópico 3.3). No entanto, quando inferimos qualquer outro organismo que o tenha na comparação, a similaridade na organização cai abruptamente. É o caso dos *operons* de biossíntese de **histidina** e **treonina**, **prolina** e **arginina**, **triptofano** e **leucina** detalhados abaixo.

Os *operons* de histidina e treonina dispostos um ao lado do outro, são formados por 8 e 3 CDS's respectivamente, porém em sentidos opostos com relação à mesma origem de replicação (*dnaA*) (ver figura 21). As CDS's que codificam para treonina sintase (B), homoserina quinase (C) e proteína bifuncional aspartato quinase/homoserina desidrogenase (D) fazem parte do *operon* relacionado com a biossíntese de treonina. O bloco de CDS's identificadas com suas respectivas identificações gênicas compreendem o *operon* de histidina. A CDS que compreende uma enolase-phosphatase (F), apesar de não estar diretamente relacionada à biossíntese de histidina, pode atuar como uma hidrolase capaz de reaproveitar metionina (via de salvamento) em bactérias gram-negativas. É importante observar que duas CDS's relacionadas ao transporte de aminoácidos catiônicos (HI) estão localizadas ao lado do *operon* de histidina e portanto poderiam relacionar-se ao transporte dos aminoácidos supracitados. Observa-se que algumas CDS's estão presentes em *Xanthomonas citri* e ausentes em *Xylella fastidiosa* ou vice-versa, o que é bastante natural, tendo como modelo eventos INDEL (inserção e deleção de CDS's ao longo do genoma). Normalmente estas CDS's acabam sendo classificadas como hipotéticas por serem pequenas e por não terem uma função putativa bem definida.

Figura 21 – *Operons* de biossíntese de histidina e treonina. Apresentam-se bastante conservados, porém em sentidos opostos. A CDS que codifica uma dioxigenase (G) está relacionada com potencial de REDOX associado à vários metais; A, E e J apesar de apresentarem-se conservadas, não possuem qualquer relação com a função do *operon*.

O mesmo ocorre com o *operon* de biossíntese de prolina e arginina (ver figura 22). *Xanthomonas citri* apresenta este *operon* fragmentado pela presença de CDS's conservadas hipotéticas. Se observarmos o total de CDS's deste *operon* veremos que *Xanthomonas citri* apresenta uma CDS a mais que *Xylella fastidiosa*. Esta CDS codifica uma enzima capaz de transferir grupos acetil entre aminoácidos, denominada *argA* (amino ácido acetiltransferase), capaz de catalisar a reação: acetil-CoA + L-glutamato = CoA + N-acetil-L-glutamato, que posteriormente é convertido em ornitina, que atua diretamente no ciclo da uréia.

Figura 22 – *Operon* de biossíntese de prolina e arginina. As CDS's que compreendem este *operon* são bastante conservadas, com exceção da *argA* encontrada apenas em *Xanthomonas citri* e que codifica uma enzima capaz de transferir grupos acetil entre aminoácidos. Maiores detalhes ver o texto.

Da mesma forma que nos *operons* de histidina e treonina, há a presença de transportadores de membrana, como é o caso das CDS's que codificam para **MFS** e **ABC transportadores**. Nas proximidades do *operon* de ambas as bactérias também encontra-se uma CDS que codifica uma *drug: proton antiporter* (**B**), cuja função seria gerar uma resistência ao antibiótico tetraciclina. Ao lado desta CDS há uma outra que codifica uma proteína supressora de *dnaK* (**C**) (chaperonina membro da família das **hsp70**) e uma dihidroorotase (**D**) relacionada com a biossíntese de pirimidinas. Uma alfa hemolisina e uma peptidase estão presente apenas em *Xanthomonas citri*, assim como uma etanolamina permease localizada ao lado de duas CDS's relacionadas com o metabolismo do mesmo composto (*ethanolamine ammonia-lyase large and light subunit*). Esta alfa hemolisina (Xac2359), quando comparada contra o banco de proteínas de *Xylella fastidiosa*, apresenta uma alta identidade com uma proteína hipotética conservada (Xf0989) que chega a ter aproximadamente 75% de identidade. Curiosamente, ao lado do *operon* em *Xylella fastidiosa* há um *operon* formado por 5 CDS's hipotéticas que formam duas classes de parálogas exclusivas, um grupo formado pelas CDS's pares (XF1006/1008/1010) e outro formado pelas CDS's ímpares (XF1007/1009). Em seguida há uma hemolisina, capaz de ligar cálcio, que pode estar relacionada à patogenicidade.

Os *operons* de biossíntese de triptofano e de leucina são idênticos entre as duas bactérias (dados não mostrados). *Xanthomonas citri* ainda apresenta enzimas que poderiam converter triptofano em quinolinato e este por sua vez em NAD e nicotinamida. Em *Xylella fastidiosa* tais enzimas não foram encontradas e portanto a biossíntese destes compostos ficam restritas a duas outras possíveis vias também presentes em *Xanthomonas citri* onde: i) aspartato seria convertido a quinolinato e este por sua vez a NAD e nicotinamida; ii) ou a partir do glutamato que seria convertido

em NAD, GMP e acetilglicosamina, essencial á formação da membrana de bactérias gram-negativas. Além disso, *Xanthomonas citri* apresenta enzimas que são capazes de reaproveitarem taurina convertendo-a em alfa-cetoglutarato ou, dependendo da situação, excretá-la (assim como betaina). Na realidade taurina, glicina, betaina, prolina e colina podem estar envolvidos no processo de osmoregulação (Graham, J.E. and Wilkinson, B.J., 1992). Desta forma, em estresse osmótico, haveria uma super expressão dos genes que estariam envolvidos no metabolismo destes produtos, controlando a osmolaridade da célula. Após normalização das condições celulares, estes produtos poderiam ser convertidos no interior da célula, como é o caso da taurina, excretados como é o caso da betaina, ou mesmo reaproveitados na biossíntese de proteínas como é o caso da glicina e da prolina.

4.4.3 – Metabolismo de enxofre

O metabolismo de compostos que apresentam enxofre em sua estrutura, também é similar. Ambas conseguem converter sulfato em H₂S (sulfeto de hidrogênio) e este por sua vez, na presença de serina, pode ser convertido em cisteína e acetato. Desta forma, os produtos a base de enxofre dados como tóxicos para a célula, seriam reaproveitados na biossíntese de aminoácidos essenciais (anexo 8).

4.4.4 – Aminoacil tRNA's

Há aminoacil tRNA's para todos os aminoácidos. No caso de lisina em *Xanthomonas citri*, há uma CDS que codifica um tRNA que poderia ser expresso em condições de choque térmico (*lysyl-tRNA synthetase heat inducible* – *LysU* – Xac1876) além do tRNA expresso normalmente. Os resultados descritos podem ser vistos de uma forma compacta nos esquemas metabólicos (**ver figuras comparativas dos metabolomas - 20**).

4.4.5 - Metabolismo de Ferro

Os dados descritos no metabolismo de ferro estão diretamente ligados a outros tópicos estudados, como por exemplo: biossíntese de colicinas, receptores de membrana e transportadores de membrana.

O ferro é um dos metais mais utilizados no metabolismo de bactérias, pois está diretamente relacionado à biossíntese de citocromos, aminoácidos aromáticos e pirimidinas, além de ter uma função vital como cofatores de diversas enzimas que desempenham papel fundamental nas vias metabólicas destes organismos (Neidhardt, F.C. et al., 1996). No entanto, o Fe (encontrado normalmente em sua forma reduzida – Fe III) é insolúvel o que dificulta a sua absorção pelas bactérias. Desta forma, bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas e alguns tipos de fungos desenvolveram um sistema que facilita este transporte de ferro para o interior da célula, isto se dá pela oxidação do Fe III em Fe II a partir da produção de compostos quelatados denominados sideróforos ou ferrosideróforos (Neilands, J. B., 1995). Estes por sua vez só são produzidos em condições de escassez de Fe II. Os sideróforos, devido à sua estrutura química, conseguem ligar Fe III com maior especificidade em relação a Fe II e ao mesmo tempo conseguem ser transportados, devido à sua afinidade, por canais que fazem a comunicação entre o meio exterior e o citosol.

Comparando-se a sequência dos genes relacionados com a biossíntese de sideróforos bem conhecidos e descritos na literatura (*EntABCDEF* para enterobactina e *IucABCD* para aerobactina) contra o banco de proteínas de *Xanthomonas* e *Xylella*, não foi possível encontrar nenhuma sequência que apresentasse um bom grau de similaridade, o que descarta a possibilidade destas bactérias produzirem estes sideróforos para a captação de Fe III do ambiente. A não ser que elas sejam capazes de produzirem sideróforos espécie-específico a partir de CDS's classificadas como hipotéticas, como é o caso das pioverdinas nas bactérias do gênero *Pseudomonas* e yersiniabactina em bactérias do gênero *Yersinia*, pois verifica-se que, de acordo com Wiggerich, H. G, et al. 1997, *Xanthomonas campestris pv campestris* é capaz de produzir sideróforos (analisados pelo método de detecção universal (Schwyn, B and Neilands, J.B. 1987)), mas os mesmos não puderam ser identificados, pelo menos até o momento.

O controle e regulação de expressão gênica das CDS's relacionadas ao metabolismo de ferro estão diretamente ligadas ao gene *Fur* (*ferric uptake regulator*). Este gene atua como um bloqueador clássico, onde a expressão de *TonB* (proteína que media o transporte de ferro) é reprimida pela presença de ferro e super expressada em condições de anaerobiose (Young, G. M. and Postle, K., 1994). Mutações no gene *Fur* provocam alta pleiotropia, onde são observados principalmente defeitos

Os genes *FeoAB* (*ferrous iron uptake systems*) também estão envolvidos com o processo de transporte e regulação do metabolismo de ferro nas bactérias em condições de anaerobiose. *FeoA* não possui uma função bem conhecida mas *FeoB* em *E. coli*, corresponde a uma permease de Fe II semelhante às ATPases (Kammler, M. et al, 1993). *Xanthomonas* e *Xylella* também apresentam estes genes (Xac1854/Xac1855 e Xf0932/Xf0933). São regulados pelo gene *Fur* e pelo gene *Fnr*, um ativador de transcrição para genes envolvidos com processo de respiração em condições de anaerobiose (Neilands, J. B., 1982). Em *Xanthomonas* o gene *Fnr* refere-se à CDS Xac1825, porém em *Xylella* este gene não foi encontrado. Outro gene de grande importância no metabolismo de ferro é o gene *Fpr* (*ferredoxin–NADP reductase*). Este por sua vez apresenta várias funções entre as quais: o transporte de elétrons entre flavodoxina ou ferredoxina e NADPH; está envolvido na redução de cobalamina independentemente da ação das enzimas metionina sintase, piruvato formato liase e ribonuclease redutase anaeróbica; e também é capaz de proteger a célula contra radicais superóxidos. Apresenta-se em *Xanthomonas* como sendo a CDS Xac1458 e em *Xylella* como sendo a CDS Xf1889.

4.4.5.1 - Biossíntese de colicinas

Da mesma forma que os sideróforos, algumas bactérias são capazes de sintetizar colicinas, toxinas que, quando liberadas ao meio, são capazes de gerar um antagonismo bacteriano, propiciando uma maior facilidade na obtenção de nutrientes, por impedir que haja uma competição intraespecífica entre bactérias que dispõem dos mesmos recursos (Lazdunski, C.J. et al., 1998). São muitas as colicinas conhecidas e descritas, algumas delas específicas de cada organismo. No entanto, observa-se que elas possuem o mesmo tipo de organização, coerente com seu mecanismo de ação, compreendida em três domínios distintos: um domínio envolvido no reconhecimento de um receptor específico (ver adiante), um domínio que facilita sua translocação ao interior (quando captada) ou exterior (quando liberada) da célula, e um domínio responsável pela atividade letal.

A produção de colicina V (responsável por despolarizar a membrana plasmática levando à uma dissipação da energia celular) à partir do plasmídeo pColV-K30 em *E.coli*, é regulada pelo operon *CvpAPurF*. Onde mutações no gene *CvpA* afeta a produção desta colicina (Fath, M.J. et al, 1989). *Xanthomonas* e *Xylella* possuem este operon citado acima em organização com as CDS's que codificam os genes *FolC* e *DedD* descritos com mais detalhes na figura 24. *CvpA* é uma proteína de membrana requerida para a produção de colicina V e *PurF* corresponde a uma subunidade de uma amidofosforibosil transferase que participa da biossíntese de purinas

Figura 24 - Operon *CpvAPurF* relatado em *E.coli* como um possível regulador de biossíntese de colicina V. *Xanthomonas* e *Xylella* também apresentam este operon. *FolC* participa da biossíntese de ácido fólico, *CvpA* é uma proteína de membrana requerida para a produção de colicina V e *PurF* corresponde a uma subunidade de uma amidofosforibosil transferase que participa da biossíntese de purinas.

Xylella possui um maior número de CDS's relacionadas à biossíntese e secreção de colicina do tipo V, apresentando genes precursores, um gene produtor e um gene secretor. Em *Xanthomonas* não há indícios de seqüências similares aos precursores desta colicina. O detalhe mais importante é que as CDS's Xf1216 e Xf1220, flanqueiam pequenas CDS's hipotéticas que poderiam ser tais colicinas. Em *Xanthomonas* a CDS responsável pela possível secreção deste tipo de colicina, localiza-se cercada *upstream* por duas transposases (*Tnp's*), que provavelmente fragmentaram a organização dos genes que poderiam estar relacionados com a provável biossíntese, observadas em *Xylella* (ver figura 25).

Figura 25 - Regiões vizinhas aos genes que participam da possível biossíntese e translocação de colicina V em *Xylella* e *Xanthomonas*. As CDS's de *Xylella* que estão vinculadas à provável biossíntese de colicina V, flanqueiam três pequenas CDS's hipotéticas candidatas a serem os genes que codificam para as colicinas. Observa-se a CDS Xac4209 de *Xanthomonas* que corresponde a um ABC transportador de colicina V (Xf1220), que está localizada *downstream* de duas transposases *Tnp*, responsáveis pelo rompimento da organização de genes com o operon de *Xylella*.

Esta diferença pode estar diretamente relacionada com o ambiente onde vivem as bactérias. *Xylella* por viver no xilema e rodeada por outros patógenos endofíticos, talvez necessite deste recurso de biossíntese de colicinas, como uma forma de evitar a concorrência pelo alimento já escasso, disperso na seiva bruta.

4.4.5.2 - Receptores de membrana para ferro e colicinas

A captação de qualquer tipo de composto ferro-quelatado e/ou colicinas, fica restrita a receptores de membrana capazes de apresentar uma certa afinidade por estes compostos, muitas vezes produzidos por outras bactérias, mas que podem servir como recursos de obtenção de nutrientes dissolvidos no meio. Estes receptores apresentam-se vinculados à transportadores de membrana (descritos com detalhes adiante), capazes de promover a entrada destas substâncias necessárias ao crescimento bacteriano. A comparação entre estas duas bactérias revelou que *Xanthomonas* apresenta um grande número de CDS's (63) capazes de codificar genes relacionados à função de captação de compostos dispersos no meio. Este número fica limitado a 5 CDS's em *Xylella*, mostrando mais uma vez que *Xanthomonas*, por viver em um ambiente rico em metabólitos, talvez necessite de um número bem elevado de receptores (detalhes ver figura 27).

A tabela 9 apresenta uma comparação entre as CDS's encontradas em *Xanthomonas* e *Xylella* para função de captação de compostos ferro quelatados dispersos no meio. Abaixo encontra-se a relação e função dos genes que apresentaram alta similaridade com os respectivos genes de *E. coli*:

- *FepA* - receptor de colicinas do grupo B e D;
- *IutA* - receptor específico para enterobactina;
- *FhuA* - receptor multifuncional podendo ligar microcina 25, colicina M, albomicina e os fagos T1, T5, UC-1 e Φ 80;
- *FhuE* - receptor exclusivo para coprogênio e ácido rodoturúlico, (sideróforos hidrocarbonatos produzidos por fungos);
- *FecA* - receptor exclusivo para ferridicitrato;
- *CirA* - receptor vinculado às colicina do grupo I e V;
- *Fiu* - ligado às colicinas G, H e E492 e compostos como DHB e DBS (possíveis sideróforos por apresentarem afinidade por Fe III).

Além destes podem ser citados receptores de grupos heme, um receptor de cobalamina (B12) e até mesmo um receptor exclusivo de ferripioverdina, uma classe de sideróforos produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* sp, formados pela ligação de moléculas de cromóforo de dihidroxiquinolinonas à peptídeos de diferentes tamanhos (Abdallah, M.A., 1991) e outro receptor de bacteriocina e yersiniabactina, um sideróforo produzido por bactérias do gênero *Yersinia* sp.

Receptores	Xf	Xac	Função
BfeA	2	4	Receptor de enterobactina férrica
BfrC		2	Receptor de ferro
BtuB		11	Receptor de cobalamina; pode atuar também como receptor de bacteriófagos BF23. É necessário para captação de colicinas de <i>E.coli</i>
CirA		11	Receptor de colicinas I/Fe3, podendo atuar também como receptor de compostos catecolados
FecA		8	Relacionada com captação e transporte de dicitrato
FepA		2	Captção de ferro por adesão à ferrienterobactina (Fe-ent). Atua também como um receptor de colicinas B e D
FhuA		8	Receptor de sideróforos hidroxamatos
FhuE		2	Receptor de ferro
FpvA		1	Receptor de ferripioverdinas
FyuA		5	Receptor de bacteriocinas e do sideróforo yersiniabactina
Iron		5	Receptor de enterobactina férrica
PfeA		1	Receptor de sideróforos
PhuR	1	2	Receptor de grupos heme
Tar		1	Proteína quimiorreceptora de aspartato (MCP-II)
YbiL	1		Provável receptor dependente de TonB
YncD	1		Provável receptor dependente de TonB
Total	5	63	

Tabela 9: Comparação entre os receptores de membrana de *Xanthomonas* (Xac) e *Xylella* (Xf), capazes de ligar sideróforos, colicinas, bacteriófagos e outros compostos de grande peso molecular necessários ao metabolismo bacteriano. Comparando-se os receptores citados acima, observa-se que *Xylella* não possui similaridade com nenhum deles, ficando restrito a 2 receptores dependentes do complexo TonB (*YbiL* e *YncD*), um receptor de grupos heme (*PhuR*) e dois receptores de enterobactina férrica (*BfeA*). *Xanthomonas* apresenta todos os receptores citados acima com exceção dos genes *Fiu* e *IutA*.

4.4.5.3 - Transportadores de membrana

A membrana externa das bactérias permite a passagem de moléculas de pequena massa e hidrofobicidade por meio de poros, ou moléculas que apresentam uma grande hidrofobicidade, como é o caso de esteróides, por um processo de difusão via bicamada lipídica (Plesiat, P. and Nikaido, H., 1992). Outras moléculas que não apresentam estas características devem ser transportadas por estruturas especiais mediante gasto de energia e mudança conformacional para que o processo possa acontecer. Existem duas famílias bastante similares de transportadores de sideróforos e outras moléculas de grande peso molecular, as relacionadas ao sistema TonB e as relacionadas ao sistema TolA. Estes dois sistemas (*TonB-ExbB-ExbD* e *TolA-TolQ-TolR*) são relacionados funcionalmente e evolutivamente (Neidhardt, F.C. et al., 1996). Em alguns organismos a ausência do sistema TonB pode ser compensada pela presença do sistema TolA (Braun, V. and Herrmann, C., 1993).

Interessantemente, *Xanthomonas* e *Xylella* apresentam os dois complexos, distribuídos em seus respectivos *operons*. A CDS que codifica para a proteína *TolC* apresenta-se distanciada fisicamente do *operon* correspondente em ambas as bactérias. *TonB* é uma proteína que, apesar de localizar-se em sua grande totalidade no periplasma, está aderida na membrana citoplasmática. Apresenta três domínios: i) N terminal que apresenta um alto potencial anfipático, característico de estruturas transmembranas, que acaba servindo de âncora à membrana citoplasmática, além disso esta região permite a interação com *ExbB*; ii) um domínio central totalmente disperso no periplasma e iii) um domínio C terminal capaz de se interagir com os receptores de membrana externa (citados anteriormente). *Xylella* possui 5 e *Xanthomonas* 2 cópias deste gene. No entanto, apenas uma cópia de cada bactéria apresenta a clássica composição de aproximadamente 17 % de seus resíduos formados por prolina (Xf0009 e Xac0008)

```
>XF0009
MSEELIVHRYEQDDVSDALNWFRIIGIAFVIALHLAALMLLLIIPAASLKA
PPEKQRLAAVTIVDSPPPPPPPPPPPEQKKPAPEIKTLAPFPAVFPQPP
QPFVVDVFPQFSDVVVFPAPFAPPTPPSDISASVDISSKMNPPKYFFT
ALRAGIQGEVVLIIDVDADGNVTNVSVEKSSRNRLDRAAIDAASKWKFN
PSVINGKKSAGRVRFVNFSL*

>XAC0008
MTEQLVIERHDYDAGNQLSWARIIGIAFVIALHLTALMLLLIIPAVAPKA
PAEKERTMTVTLVDAAPPPPPPPPPPEEDKPPFVKNLSPKESFVPPP
PEAFVVDVFPQFSDIVTTPSPSPFAPPDIGASVDISSKMNPPKYFFT
AAFRAGVQGEVILIVDVDAAGNVTNVSVEKSSRNRLDRAAMDAAARKWKF
NASTVNGQKAAGRVRFVNFALN*
```

Figura 26A – Genes que codificam para a proteína *TonB* nos genomas de *Xylella fastidiosa* (acima) e *Xanthomonas citri*. Ambas apresentando a clássica composição de aproximadamente 17% dos resíduos de prolina (vermelho).

(ver figura 26A). Esta proteína funciona como um portão permitindo a entrada de compostos específicos, como é o caso de sideróforos quelatados, vitamina B12, colicinas e inúmeros fagos, sempre provida de consumo de energia, mediante força próton motriz. O mesmo ocorre com a proteína *TolA* porém sua especificidade está ligada a colicinas do grupo B e fagos T1 e Φ 80 (Lazdunski, C. J. et al., 1998). As proteínas *ExbB* e *ExbD* auxiliam no processo de transporte e regulação da entrada destas substâncias pelo sistema TonB, o mesmo pode ser dito nas proteínas *TolQ*, *TolB* e *TolR* pelo sistema TolA (detalhes ver figura 27).

Verifica-se que os complexos responsáveis principalmente por aquisição de ferro são fundamentais para desenvolvimento bacteriano e patogenicidade. Comparando o total de CDS's que codificam para receptores destes compostos citados acima, observamos que *Xanthomonas* apresenta um número bastante elevado de genes para esta função (63) quando comparado com *Xylella fastidiosa* (5). Este número pode refletir sua adaptação no mesofílio foliar e curva de crescimento (detalhes ver tabela 9).

A organização de genes relacionadas ao *operon* do sistema TonB, só é visto nos genomas de *Xylella* e *Xanthomonas*. Isso porque a dupla cópia do gene *ExbD* (denominados *ExbD1* e *2* em *tandem*), ao lado dos genes *TonB* e *ExbB*, só foram encontrados nestas bactérias (ver figura 26B). Em *Pseudomonas aeruginosa* observa-se que os genes *ExbD* e *ExbB* também apresentam-se em

duplicatas, mas não em *tandem* como visto em *Xylella* e *Xanthomonas*. O gene *exbD* encontra-se sempre acompanhado do gene *ExbB*, mas bem distantes da única cópia do gene *TonB*.

Mutações nos genes *TonB-ExbB-ExbD1-ExbD2* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* inibem a indução de resposta hipersensível em *Capsicum annuum* (Wiggerich, H. G. and Pühler, A. 2000). No entanto o gene *ExbD2* não é essencial para a obtenção de ferro em *Xanthomonas campestris* (Wiggerich, H. G, et al. 1997). As imagens da figura 27 mostram: A) diferenças na resposta de hipersensibilidade do vegetal *Capsicum annuum* – pimenta, ao ser infectada com *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc) tipo selvagem (1-WT), e mutantes de *TonB* (2), *ExbB* (4), *ExbD1*(5), *ExbD2* (6) e até mesmo de uma região intergênica deste *operon* (3); B) diferenças nos sintomas da podridão negra do repolho (*Brassica oleracea*) ao ser infectada por Xcc WT (1), e mutantes de *ExbD2* (2) e *TonB* (3) (Wiggerich, H. G, et al. 1997).

Figura 26B – A organização *TonB* (vermelho), *ExbB* (verde), *ExbD1* (amarelo) são encontrados em outros organismo. No entanto o gene *ExbD2* só é visto em *tandem* a este *operon* nos genomas de *Xylella* (segundo bloco em amarelo) e *Xanthomonas* (não descrita). Dados extraídos do programa String (Snel, B. et al., 2000)

O sistema TolA das duas bactérias é idêntico. *Upstream* deste *operon* encontram-se: o gene *OmpP6*, similar ao gene *Pal* (lipoproteína associada ao peptidoglicano) de *E.coli*. (Lazdunski, C. J., et al., 1998), que estaria diretamente envolvida com o sistema geral de transporte de lipoproteínas, mediados pelos genes *LolA* e *LolB* (Matsuyama, S. et al., 1997) também encontrados em *Xylella* (Xf1452 e Xf2646) e *Xanthomonas* (Xac2008 e Xac0947); proteínas regulatórias relacionadas a um sistema de duplo componente regulatório – *ExsB*, que de acordo com o COG (Tatusov, R.L. et al., 1997), teria a função de conferir uma resistência ao alumínio. Este gene apresentou alta similaridade com uma proteína hipotética de *Pseudomonas aeruginosa* PA0976, com *score* de 4e-85 e 69 % de identidade em seus resíduos. Em ambas as bactérias a região *downstream* apresenta a mesma organização, onde observa-se a presença de um *operon RuvBAC*, separados por uma proteína regulatória, responsável pelo influxo de potássio. *RuvBA* apresentam domínios de ATPases e são responsáveis por renaturarem estruturas cruciformes de DNA *supercoil* com seqüências palindrômicas, indicando que isto pode promover uma reação de mudanças de fitas em recombinação homóloga (West, S.C., 1997 e Shinagawa, H., 1988). Em *E.coli*, estes genes são induzidos por efeitos de dano ao DNA e regulados por ação da proteína *LexA* em resposta SOS (Benson, F.E., 1988). *RuvC* apresenta o domínio de clivagem de estruturas secundárias (Takahagi, M., 1991) (ver figura 28).

A expressão dos genes *TolQRA* é regulada pelo gene *RcsC*, uma proteína de membrana interna pertencente a um sistema de duplo componente regulatório (*RcsC-RcsB*), envolvidos na regulação da síntese capsular (Gottesman, S. and Stout, V., 1991). Para averiguarmos a presença deste gene, comparamos a seqüência de *RcsC* contra o banco de proteínas das duas bactérias.

Em *Xanthomonas* a seqüência apresentou identidade de 31% com a CDS Xac0494 (3.1 Mb distante deste *operon*) num *score* de 3e-59. Esta CDS corresponde ao sensor de um duplo componente regulatório, o que condiz com sua função geral. Toda a similaridade da CDS Xac0494 com a proteína regulatória *RcsC* encontra-se na região carboxi terminal, mostrando ser uma região bastante conservada entre sensores de duplos componentes regulatórios. Desta forma, poderíamos prever que a CDS *downstream* corresponderia ao gene *RcsB*. No entanto, esta informação não é similar aos dados encontrados quando comparamos a seqüência do gene *RcsB*, contra o banco de dados de *Xanthomonas*. Nenhum dos alinhamentos encontrados corresponde à CDS Xac0495, mesmo ela sendo uma proteína sensora.

Por encontrarmos o gene *Bfr* (função de estocagem ou detoxificação de compostos ferro quelatados), flanqueado pela CDS Xac0494, e por uma bacterioferritina associada à ferredoxina (relacionada a um potencial REDOX e participando como um componente regulatório do gene *Bfr*), deduzimos que as CDS's Xac0494 e 0495 correspondem respectivamente aos genes *RcsCB*, por

apresentarem funções correlatadas. Em *Xylella* encontramos o gene *Bfr* (XF0395) e o gene que codifica para a bacterioferritina (XF0394), na mesma disposição de *Xanthomonas*, mas flanqueados por 4 CDS's hipotéticas. Curiosamente estas pequenas CDS's quando comparadas contra o banco de dados de *Xanthomonas*, apresentaram a melhor similaridade com a CDS Xac0495, mostrando que o provável gene *RcsC* em *Xylella*, sofreu inúmeras mutações e acabou sendo fragmentado em quatro pequenas CDS's ao longo da evolução (ver figura 28). Estes são indícios de que talvez a regulação dos genes *Tol* em *Xylella* sejam, mediados por outros genes correspondentes a duplos componentes regulatórios, capazes de exercer a mesma função dos genes *RcsBC* (apesar do grau de similaridade de suas seqüências não expressarem isso), ou que esta regulação se dê por alguma outra forma não descrita até o momento.

Figura 28 - Distribuição das CDS's do operon relacionado ao complexo TolA em *E. coli*, *Xanthomonas* e *Xylella*. O operon *PalTonBARQ* em *E. coli* é cercado por CDS's hipotéticas, a mesma organização pode ser vista no genoma de *Xanthomonas* e *Xylella*. Ao lado apresenta-se um esquema representativo da CDS que provavelmente corresponde ao gene *RcsC* responsável pela regulação do sistema TolA em *Xanthomonas* e *Xylella*. *Upstream* deste operon encontram-se as proteínas responsáveis pela estocagem de ferro quelatados no interior da bactéria (bacterioferritina - *Bfr* e bacterioferritina associada à ferritina) e *downstream* encontram-se um operon formado por 6 CDS's hipotéticas ao lado de uma transposase (*tnpN*). Sendo quatro destas CDS's hipotéticas conservadas em *Xylella*. As CDS's contornadas por cores em *Xylella*, compreendem a 4 fragmentos da CDS equivalente ao gene *RcsC* de *Xanthomonas*, representando uma provável fragmentação da mesma ao longo da evolução.

Em resumo, a regulação e metabolismo de genes relacionados ao ferro são bastante similares entre estas bactérias. A grande diferença está no número de genes relacionados com a captação de compostos ferro quelatados e colicinas. Se todos estes genes forem funcionais em *Xanthomonas*, a capacidade de recepção destes compostos dissolvidos no mesófilo foliar, seria bem superior à captação destes mesmos compostos por *Xylella* no xilema. Isso induziria uma maior expressão dos genes relacionados ao metabolismo de ferro, por exemplo, que acabariam influenciando as curvas de crescimento em *Xanthomonas*. Isso nos levaria à conclusão de que a concentração destes produtos é menor no xilema, a demanda de receptores é baixa em *Xylella* refletindo no lento crescimento desta bactéria em meio definido. Em compensação, *Xanthomonas* estaria dispersa num ambiente rico em compostos, apresenta uma grande demanda e diversidade de receptores facilitando seu crescimento e desenvolvimento.

A hipótese de que ao longo da evolução houve um evento de duplicação gênica, cuja função estaria diretamente relacionada ao nível de expressão destas CDS's pela bactéria, vinculadas à sua necessidade de se adaptar ao ambiente em que vive, é provavelmente descartada pelo fato de que, ao compararmos o **Xac-ssII-c2**, tanto com o **Xac-ssII-c1** de *Xanthomonas* quanto com o **Xf-ssII** de *Xylella* verificamos que, além de existir pequenas diferenças na distribuição das CDS's no *operon*, o grau de identidade cai abruptamente quando alinhadas por Blast 2 seqüências (Tatusova, T. A. et al., 1999) (ver tabela 10). Isso não é observado quando comparamos o **Xac-ssII-c1** de *Xanthomonas* com o *operon* correspondente em *Xylella*, a distribuição destas CDS's é idêntica, assim como o grau de identidade que apresenta-se super conservado, chegando em média a 70% de seus resíduos, o que limitava a teoria levantada.

Xf-ssII			Xf-ssII x Xac-ssII-c1		Xac-ssII-c1			Xac-ssII-c1 x Xac-ssII-c2		Xac-ssII-c2		
CDS	gene	Org	Identities	Positives	CDS	gene	Org	Identities	Positives	CDS	gene	Org
1517	XpsE	Xcc	81%	90%	3544	XpsE	Xcc	42%	60%	0694	XcsC	Ec
1518	XpsF	Xcc	68%	82%	3543	XpsF	Xcc	33%	49%	0696	XcsE	Cc
1519	XpsG	Xcc	79%	86%	3542	XpsG	Xcc	34%	46%	0697	XcsF	Cc
1520	XpsH	Xcc	65%	85%	3541	XpsH	Xcc	Sem similaridade		0698	XcsG	Cc
1521	XpsI	Xcc	57%	69%	3540	XpsI	Xcc	Sem similaridade		0699	XcsH	Cc
1522	XpsJ	Xcc	56%	70%	3539	XpsJ	Xcc	Sem similaridade		0700	XcsI	Cc
1523	XpsK	Xcc	61%	76%	3538	XpsK	Xcc	27%	39%	0701	XcsJ	Cc
1524	XpsL	Xcc	60%	74%	3537	XpsL	Xcc	Sem similaridade		0702	XcsK	Cc
1525	XpsM	Xcc	70%	84%	3536	XpsM	Xcc	Sem similaridade		0703	XcsL	Cc
1526	XpsN	Xcc	58%	72%	3535	XpsN	Xcc	Sem similaridade		0704	XcsM	Cc
1527	XpsD	Xcc	68%	78%	3534	XpsD	Xcc	21%	39%	0705	XcsN	Vc
										0695	XcsD	Cc

Tabela 10: - Similaridade entre as CDS's que compreendem o(s) *operon*(s) de sistema secretório do tipo II em *Xylella* (Xf-ssII) e em *Xanthomonas* (Xac-ssII-c1 e Xac-ssII-c2) utilizando o Blast 2 seqüências com a matriz Blosun62 (Tatusova, T.A. et al., 1999). O primeiro alinhamento refere-se a uma comparação entre as respectivas CDS's dos *operons* **Xf-ssII** e **Xac-ssII-c1**, enquanto o segundo alinhamento refere-se a uma comparação entre **Xac-ssII-c1** e **Xac-ssII-c2**. O grau de similaridade entre as seqüências comparadas é sempre maior entre Xf-ssII e Xac-ssII-c1. As CDS's do segundo alinhamento que apresentam-se como **Sem similaridade**, possuem uma baixa similaridade, que acabaram sendo desprezadas pela matriz do programa. Todas as CDS's do Xf-ssII e Xac-ssII-c1 deram similaridade com *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, enquanto as do Xac-ssII-c2 apresentaram a maioria de suas similaridades com *Caulobacter crescentus* (acompanhar legenda da figura 30)

Para reforçar a idéia de que o *cluster* **Xac-ssII-c2** não se formou por evento de duplicação, verificamos com quais organismos estas CDS's deram similaridade. Com isso, poderíamos verificar se outros organismos apresentavam a mesma distribuição de CDS's e ao mesmo tempo um grau de similaridade maior do que quando comparado com o **Xac-ssII-c1**. Das doze CDS's do *operon* **Xac-ssII-c2**, pelo menos dez apresentaram *Caulobacter crescentus* como sendo o primeiro organismo a ter esta similaridade, e não *Xylella* ou *Xanthomonas* sp, como era de se esperar num evento de duplicação gênica, por serem filogeneticamente próximas (Preston, G.M. et al., 1998). Se pegarmos 5

CDS's que circundam tal *operon*, tanto a esquerda (*upstream*) como a direita (*downstream*), pelo menos 3 delas também são similares a *Caulobacter crescentus*. Isso nos levaria a uma prévia conclusão de que este *operon* (**Xac-ssII-c2**) poderia ter sido transferido lateralmente para *Xanthomonas* ao longo do tempo, ou seja, teríamos uma provável ilha de transferência lateral (apesar de não ser flanqueada por elementos transponíveis) que compreenderia aproximadamente 21 CDS's que apresentam alta similaridade com *Caulobacter crescentus* (ver figura 30)

Uma outra ferramenta foi utilizada para verificação das hipóteses referidas, o String (Snel, B. et al., 2000). Este programa verifica a organização de genes que podem ser encontradas a partir de uma CDS conhecida entre os genomas seqüenciados e publicados. Desta forma, poderíamos a partir de uma CDS pré-estabelecida de *Xylella* (por apresentar seu genoma já publicado), verificarmos quais organismos possuíam tais distribuições e arranjos gênicos. O único organismo que apresentou tal similaridade foi *Caulobacter crescentus*, reforçando, mais uma vez, a idéia de transferência lateral. *Pseudomonas aeruginosa* também apresentou os mesmos genes, mas a distribuição de suas CDS's no *operon* é completamente diferente (dados não mostrados). Logo, se realmente houve um processo de transferência lateral, isso deve ter ocorrido depois da divergência evolutiva entre *Xylella* e *Xanthomonas* e antes do processo de bifurcação entre as duas *Xanthomonas*.

Baseando-se na hipótese de que houve uma possível perda do ssII-c2 em *Xylella*, verificamos se as CDS's de *Xanthomonas* que deram similaridade com *Xylella* (*up* e *dowstream* do provável bloco de transferência), apresentavam a mesma organização quando comparadas. Desta forma poderíamos notar se, ao retirarmos este bloco formaríamos um conjunto de CDS's sintênicas entre as duas bactérias, que poderia explicar uma possível perda deste *operon* em *Xylella*. Após este feito, notou-se que as CDS's citadas apresentam-se com mesma organização com um pequeno intervalo formado por duas CDS's (Xf1460 - glucose quinase e Xf1461 – proteína hipotética) (ver figura 30). Desta forma, apesar de serem fortes os indícios que mostram um possível evento de transferência lateral em bloco, não podemos descartar a hipótese de perda do ssII-c2 em *Xylella*.

Figura 30 – Operons de sistema secretório do tipo II encontrados em *Xylella* (Xf-ssII) e em *Xanthomonas* (Xac-ssII-c1 e Xac-ssII-c2). Quando comparamos com quais organismos as CDS's destes operons deram similaridade, notamos que no cluster **Xac-ssII-c1** todas as CDS's deram similaridade com *Xanthomoneaceas*, assim como as CDS's vizinhas a ele. No caso do cluster **Xac-ssII-c2** a maioria das CDS's deram similaridade com *Caulobacter crescentus*, bem como as CDS's vizinhas. Isso reforça a idéia de que, não somente o operon de ssII, mas também CDS's que o circundam, possam ser produtos de uma possível transferência lateral em bloco (delimitadas por linhas pontilhadas), que compreenderia aproximadamente 21 CDS's. No entanto, ao observarmos as CDS's que circundam este possível bloco de transferência lateral notamos que dão similaridade com outros organismos que não seja *Caulobacter* e ainda apresentam-se sintênicas às CDS's de *Xylella*, que viria contrariar a idéia levantada (dando a idéia de que *Xylella* possa ter perdido estas seqüências). As CDS's em rosa, assinaladas entre linhas pretas, apresentam-se em organização com as CDS's 2612 a 2614 do genoma de *Xanthomonas*.

4.4.7 - Operon de goma e genes rpf

Xylella e *Xanthomonas* são bactérias capazes de produzirem goma xantana, um polissacarídeo extracelular formado por polímeros de pentassacarídeos, que pode estar diretamente envolvido com processo de infecção e patogenicidade (Denny, T. P., 1995). Este produto é formado por um operon denominado “*Gum*” que apresenta-se divergente quando comparamos estas bactérias. *Xylella* apresenta este operon formado por 11 CDS's, onde apenas 9 foram classificadas com uma função putativa relacionada (*GumB* – *GumM*), as outras duas CDS's foram classificadas como sendo hipotéticas, por não apresentarem qualquer similaridade com seqüências depositados no banco de

genes. *Xanthomonas*, assim como *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, apresentam este mesmo *operon* mais completo, com 12 CDS's (*GumB* – *GumM*) (Dow, J.M. and Daniels, M.J., 2000). Esta diferença no número de CDS's que participam do *operon* de produção de goma entre *Xylella* e *Xanthomonas* é dada pela ausência das CDS's *GumG*, provavelmente relacionada com acetilação de mannose, *GumI* que codifica para uma glicosil transferase do tipo V, responsável pela transferência de um resíduo de beta-manosil de GDP-manose para glucoronil-(B1,2)-mannosil-(alpha-1,3)- celobiose difosfopoliprenol, e *GumL* que codifica para uma enzima cetol pivuvato transferase, responsável por inserir um grupo piruvato junto ao polissacarídeo (Katzen, F. et al., 1998) (ver figura 31 e tabela 11).. Além disso, ambas as bactérias possuem as CDS's que codificam os genes *XanA* fosfoglicomutase/fosfomanomutase (EC 5.4.2.2) e *XanB* fosfomanose isomerase/GDP-manose pirofosforilase (EC 5.3.1.8), também envolvidos na produção de goma.

Xf – gum genes		Xac – gum genes		Alinhamento	
CDS	gene	CDS	gene	Identidade	Positivos
2360	GumM	4272	GumM	64%	72%
	ausente	4274	GumL		
2361	GumK	4275	GumK	71%	81%
2362	GumJ	4276	GumJ	66%	80%
2363	hipotética	4277	GumI	Sem similaridade	
2364	GumH	4279	GumH	65%	77%
	ausente	4282	GumG		
2365	GumF	4284	GumF	46%	60%
2366	GumE	4285	GumE	63%	77%
2367	GumD	4286	GumD	74%	85%
2368	hipotética		ausente		
2369	GumC	4288	GumC	64%	80%
2370	GumB	4289	GumB	67%	83%
0260	XanA	3111	XanA	83%	89%
0259	XanB	12	XanB	82%	88%

Tabela 11: - Similaridade entre as CDS's que compreendem o *operon* de biossíntese de goma entre *Xylella* e *Xanthomonas* utilizando o Blast 2 seqüências com a matriz Blosum62 (Tatusova, T.A. et al., 1999). Em *Xylella* ausentam-se as CDS's *GumLIG*. As CDS's que apresentam com resultado de alinhamento **Sem similaridade**, possuem um baixo grau de similaridade de tal forma que a matriz do programa acabou descartando qualquer forma de alinhamento.

Figura 31: - Representação esquemática de distribuição das CDS's no *operon* de produção de goma em *Xylella* e *Xanthomonas*. *Xylella* possui 11 CDS's sendo que duas foram classificadas como hipotéticas (*GumMKJhypHFEDhypCB*). *Xanthomonas* possui um total de 12 CDS's (*GumMLKJIHGFEDCB*). As linhas pontilhadas representam ausência de CDS's.

A ausência dos genes *GumL* e *GumG* no genoma de *Xylella fastidiosa* não parecem ser fatores limitantes para a sua biossíntese. Katzen, F. E colaboradores (1998), descrevem e propõe um esquema de biossíntese deste composto, que poderia ser suprido pela ausência dos genes supracitados, uma vez que *GumG* poderia ter sua função substituída por *GumF* durante a acetilação dos resíduos de

manose (por apresentarem a mesma função); e *GumL* não parece ser relevante para o fato patogenicidade, uma vez que, quando mutada não promove alteração nenhuma quanto à virulência do patógeno em relação aos outros genes do mesmo *operon* (ver figura 32)

Figura 32: Representação esquemática dos prováveis eventos que participam da biossíntese de goma, de acordo com os trabalhos de Katzen, F. et al. (1998). GT – representa os genes com função de glicosiltransferases; AT que promovem transferências de grupos acetil (acetiltransferases); KPT equivale a um cetol piruvato quinase. Glc – Glicose; Man – Manose; GlcA – Ácido glicurônico; Ac – grupos acetil; Pyr – grupos piruvil. Barra amarela representa os preníis. O gráfico representa o fator de virulência (abscissa) pelo gene mutado correspondente (ordenada). O gráfico representa a taxa de virulência de acordo com a importância de cada gene do operon de goma quando mutado, sendo que da esquerda para a direita destacam-se: A – controle negativo; B – WT – Wild Type; C – GumL; D – GumF; E – GumG; F – GumI; G – GumD e H – *ugp**.

De acordo com Vojnov, A.A. et al. (2001), a regulação da expressão dos genes relacionados ao *operon* de produção de goma em *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, está diretamente relacionada à concentração de açúcar no ambiente, principalmente no que diz respeito aos açúcares glicose, sacarose, maltose, celobiose, manose e xilose. Vale ressaltar que a produção de goma num meio contendo açúcar inicia-se posteriormente à fase exponencial de crescimento bacteriano.

Baseando-se nestas informações, estamos interessados em saber se a relação de genes de goma em ambas as bactérias apresentam o mesmo padrão de expressão, por crescerem em ambientes com diferentes concentrações e disponibilidade de açúcares. Teoricamente, *Xylella* deveria ter níveis de expressão destes genes inferiores aos níveis de expressão em *Xanthomonas*, por viver no xilema. Tentaremos esclarecer esta idéia nos experimentos de *microarray* de *Xylella* crescida em diferentes concentrações de glicose.

Em *Xanthomonas*, a produção de goma e outros fatores de virulência são controlados pelos genes *Rpf's* (fatores de regulação de patogenicidade) (Vojnov, A.A. et al., 2001). Tomando como exemplo *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, observa-se a presença de seis genes contíguos *RpfABFCHG* onde, qualquer mutação por inserção de um transposon reduz a biossíntese de todas as enzimas extracelulares e EPS. (Slater, H. et., 2000). Cada um destes genes apresenta uma característica funcional peculiar que está diretamente relacionada à funcionalidade do *operon*: *RpfA* codifica para uma aconitase, cuja função está relacionada à homeostasia por ferro (Wilson, T.J.G. et al., 1998); *RpfB* codifica uma acil-coA ligase de uma cadeia longa de ácidos graxos e *RpfF* esta diretamente relacionada na regulação mediada por pequenas moléculas difundidas denominadas DSF (diffusible signal factor), moléculas estas essenciais para o processo de comunicação entre as bactérias de mesmo ambiente, conhecido como “*quorum sensing*” (Barber, C.E. et al., 1997); *RpfC* codifica um regulador híbrido de dois componentes, contendo um domínio que atua como sensor e outro que atua como regulador (Tang, J.L. et al., 1991); *RpfG* codifica para um regulador de resposta não muito comum e *RpfH* para um domínio de entrada que serve como sensor para *RpfC* (Slater, H. et., 2000). *RpfDEI* encontram-se à direita do *cluster* principal citado acima e podem ser agrupados com genes de diversas funções (onde apenas *RpfE* apresentou características que poderia relacioná-lo com a produção de fatores de difusão (DF) durante eventos de “*quorum sensing*”; *RpfD* e *I* não apresentaram funções características próprias).

Quando comparamos a similaridade entre os genes *Rpf* de *Xylella* e *Xanthomonas*, verificamos divergências no número de CDS's, bem como na sua distribuição pelo genoma (ver figura 33 e tabela 12). O *operon* de *Rpf* em *Xylella* apresenta-se truncado quando comparado com as CDS's de *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. Os genes *RpfAB* apresentam-se bem distantes dos genes *RpfFCG* (780 kb). Além disso em *Xylella* ausentam-se os genes *RpfNDHI*. Quando comparamos as duas *Xanthomonas*, observa-se que há uma organização perfeita do *operon* com exceção das CDS's que codificam para *RpfHI* ausentes em *Xanthomonas*. A região compreendida entre as CDS's que codificam os genes *RecJ* e *RpfD* de *Xanthomonas campestris*, parece ser uma região bastante instável do ponto de vista estrutural. Em *Xylella* toda esta região mais o gene *RpfD* parece ter sofrido uma

excisão. Em *Xanthomonas* esta mesma região provavelmente foi abalada pela inserção de dois elementos transponíveis acompanhados de pequenas CDS's hipotéticas flanqueadas por proteínas de membrana. Isso pode refletir na regulação geral dos fatores de patogenicidade.

Figura 33: - Operon de genes *Rpf* presente nos três fitopatógenos: *Xylella*, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* e *Xanthomonas*. Algumas diferenças podem ser citadas no que diz respeito à organização dos genes, como é o caso da região entre os genes *RecJ* e *RpfD* em *Xanthomonas* (assinaladas entre linhas pontilhadas), que apresenta duas transposases (*TnpN*). *Xanthomonas* também não apresenta a CDS que codifica uma *RpfHI*, detalhada em linha pontilhada. A mesma ausência pode ser observada em *Xylella*. Esta por sua vez apresenta as CDS's *RpfA* e *RpfB* separadas por um grande rearranjo gênico que promoveu a ruptura do operon, visto por completo nas *Xanthomonas* sp. O bloco de CDS's que fica entre os genes *RecJ* e *PrfB* também ausente.

<i>Xf</i>		Blast <i>Xf</i> x <i>Xac</i>		<i>Xac</i>		Blast <i>Xac</i> x <i>Xcc</i>		<i>Xcc</i>		Função
CDS	gene	I %	S %	CDS	gene	I %	S %	CDS	gene	
1109	RpfE	64	72	2504	RpfN	96	97	2372	RpfN	Regulador dos fatores de patogenicidade
				1864	RpfE	83	90	1845	RpfE	Proteína regulatória
				1874	RpfD	58	65	1851	RpfD	Proteína regulatória
1113	RpfG	77	85	1877	RpfG	96	98	1854	RpfG	Duplo componente regulatório, proteína regulatória
								1855	RpfH	Duplo componente regulatório envolvido com HD-GYP
1114	RpfC	52	65	1878	RpfC	54	66	1856	RpfC	Duplo componente regulatório, proteína sensora
1115	RpfF	44	64	1879	RpfF	51	66	1857	RpfF	Síntese de DSF (diffusible signal factor)
0287	RpfB	72	86	1880	RpfB	93	96	1858	RpfB	Síntese de DSF (diffusible signal factor)
0290	RpfA	77	83	1882	RpfA	90	92	1860	RpfA	Aconitase
								1847	RpfI	Proteína regulatória

Tabela 12: - Comparação entre as CDS's relacionadas à fatores de regulação de patogenicidade em *Xylella* (*Xf*), *Xanthomonas* (*Xac*) e *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*). Blast – refere-se a uma comparação das seqüências entre XF e Xac e entre Xac e Xcc; I % = porcentagem de identidade; S % = porcentagem de similaridade.

4.4.8 - Quimiotaxia e Biossíntese Flagelar

O fenômeno de locomoção de algumas bactérias num meio fluido, de um ambiente de baixa para um ambiente de alta concentração de nutrientes ou, até mesmo, como uma forma de se refugiarem de repelentes químicos, é conhecido como quimiotaxia (Alberts, B. et al. 1998). Para tanto, é necessário que tais bactérias apresentem uma ou mais estruturas conhecidas como flagelos, capazes de promoverem movimentos rotatórios sobre seu próprio eixo, permitindo a movimentação das mesmas. O movimento deste flagelo permite que as bactérias possam se locomover em maior ou menor velocidade dependendo do fim que lhe é destinada. Em termos moleculares, podemos dizer que uma série de genes estão envolvidos na biossíntese e no processo de motilidade flagelar, ativando e desativando-se conforme a necessidade.

Xylella não apresenta nenhuma CDS relacionada à esta função, o que condiz com o fato de não possuir flagelo. Provavelmente, sua locomoção no vegetal está associada ao fluxo de seiva ao longo dos vasos lenhosos. Em contra partida, *Xanthomonas*, apresenta um complexo sistema de genes relacionados à biossíntese e funcionalidade do flagelo.

Em relação aos genes presentes, verifica-se que eles estão dispersos em 6 *clusteres* ao longo do genoma. A figura 34 apresenta a distribuição destes *clusteres* que foram numerados de 1 a 6, partindo-se da origem de replicação (*dnaA*).

Observa-se que três deles (2,3 e 4) compactam-se em uma região de aproximadamente 127 kb (barra vertical em vermelho). Entre estes três *clusteres* compactados, há pequenos blocos de CDS's que apresentam-se delimitados por linhas. O primeiro bloco (*boxI*) é composto 20 CDS's (aproximadamente 22.500 pb) sendo a sua grande maioria elementos transponíveis (5) e CDS's hipotéticas (10). Isso nos levaria a idéia de uma inserção deste bloco de CDS's ao longo da evolução e que consequentemente rompeu a linearidade de um *cluster* único relacionado à esta função. Já entre os *clusteres* 3 e 4 há uma região de aproximadamente 13.212 pb com 17 CDS's (*boxII*) com as mais distintas classificações funcionais. Neste caso não há condições de inferir a mesma hipótese sugerida para o *boxI*.

Os *clusteres* 1, 2, parte do 3, 5 e 6, estão diretamente relacionados com os eventos de regulação dos fenômenos quimiotáticos (genes sinalizados em verde) enquanto os *clusteres* 3 e 4 estão relacionados com a biossíntese flagelar (sinalizados em laranja).

Figura 34: Esquema representativo dos *operons* relacionados com a biossíntese flagelar e fenômeno de quimiotaxia em *Xanthomonas*. Observa-se que quatro grandes *clusters* (2,3 e 4) encontram-se compactados em uma pequena região bem delimitada do genoma ocupando cerca de 126.3 kb. Enquanto 3 outros pequenos *operons* apresentam-se distribuídos ao longo do genoma. Entre os *operons* 2 e 3 observa-se a presença de 20 CDS's totalizando cerca de 22.479 bp (*box I*). Já entre os *operons* 3 e 4 há a presença de 17 CDS's que totalizam cerca de 13.212 bp (*box II*), maiores detalhes ver texto..

O terceiro e quarto *cluster* detalhado na figura 34, correspondem aos genes relacionados com biossíntese flagelar (representados em laranja). Um esquema representativo dos genes que codificam para os diferentes proteínas do complexo flagelar podem ser visualizados na figura 35. São muitos os genes para esta função, no entanto podemos fazer uma prévia classificação dos genes que estão relacionados: com a biossíntese do gancho e seus acessórios (estrutura externa do flagelo); com a formação do corpo flagelar (região entre membranas); e genes da região basal onde encontram-se também os genes que atuam como rotores de sua movimentação – *FliM* (localizados entre a membrana celular e o citoplasma).

Figura 35: Representação esquemática dos complexos que formam o flagelo, acompanhado dos respectivos genes que os codificam (laranja). Todos os genes apresentados estão dispostos nos *clusters* gênicos apresentados na figura 34. De acordo com os sinais externos o flagelo pode se movimentar no sentido anti-horário (CCW) caracterizando um movimento linear, dados por compostos repelentes; ou se movimentar no sentido horário (CW) caracterizando movimentos em cambalhotas, dados por compostos atraentes.

O processo de regulação da atividade flagelar em resposta aos estímulos do meio são mediados pelos genes *Che*. Cada gene pertencente a esta classe, apresenta uma função distinta, mas que em conjunto estimulam a movimentação do flagelo, permitindo que a bactéria possa se locomover em meio fluido, tanto em direção a um composto atrativo, como se deslocando em sentido oposto a um composto repelente (nocivo). Abaixo estão descritas as funções de cada gene que participa dos fenômenos de regulação da mobilidade flagelar (acompanhar a figura 36):

- *Mcp's* – são proteínas relacionadas com a transferência de sinais entre o meio periplasmático e o citoplasma. Esta transferência dá-se por regulação da proteína *CheA* (citoplasmática). O intercâmbio entre o meio externo e o espaço periplasmático é feito por receptores específicos. Uma vez ligado (composto/receptor), há uma mudança conformacional na proteína *Mcp*, em especial no domínio sensorial, que promoverá a metilação ou desmetilação dos resíduos de glutamato nos domínios *MH*, que induzirão a cascata de reações de fosforilação/desfosforilação até que ocorra a movimentação flagelar.

Os eventos de metilação são mediados por *CheR* e os de desmetilação por *CheB*. *Xanthomonas* possui inúmeras cópias de genes *Mcp's* que podem ser classificados da seguinte forma: *Tsr* - relacionados com serina (12), *Tar* - relacionado com aspartato ou maltose (1) outros *Mcp's* (5);

- *CheA* – corresponde a uma histidina quinase. Está ancorada em *CheW*, e uma vez fosforilada, ativa a proteína *CheY*, por transferência do grupo fosfato;
- *CheW* – proteína que media o intercâmbio entre as proteínas *Mcp's* e *CheA*;
- *CheY* – é a proteína que atua diretamente na ativação das proteínas que formam a base flagelar (rotor), estimulando a sua movimentação em sentido anti-horário (repelente). Esta indução das proteínas flagelares dá-se ao se fosforilar. A defosforilação desta proteína por *CheZ*, estimula a movimentação flagelar em sentido horário (atrativo);
- *CheB* – promove os eventos de desmetilação dos resíduos de glutamato dos domínios de metilação das proteínas *Mcp's*;
- *CheR* – promove os eventos de metilação dos resíduos de glutamato dos domínios de metilação das proteínas *Mcp's*;
- *CheZ* – atua como um modulador da atividade de *CheY*, defosforilando-o, inativando a mobilidade flagelar induzida por fenômenos de fosforilação de *CheY*.

Figura 36 – Esquema representativo da cascata de sinalização e movimentação flagelar por ativação dos genes *Mcp's* e genes *Che* (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000).

Até o momento, não havia sido descrito em nenhum outro organismo a presença de 10 CDS's em *tandem* que codificam para as proteínas *Tsr* (proteína de quimiotaxia), localizadas no segundo *cluster* apresentado na figura 34. Quando alinhadas pelo programa de múltiplos alinhamentos as proteínas *Tsr* apresentam-se extremamente similares a genes nomeados como possíveis *Mcp's* (*Methyl-accepting chemotaxis protein*) e até mesmo com a proteína *PilJ*, formando um grupo de 20 CDS's paralogas com *E-value* que varia entre 1e-10 e 1e-20. Uma análise mais a fundo destas seqüências, revelou que a CDS Xac3099 que codifica para *PilJ*, citada acima, é similar aos genes *Mcp's* apenas no domínio de sinalização, bastante conservado.

A figura 37 apresenta um alinhamento múltiplo de seqüências que codificam para as proteínas *Mcp's* (*Tsr*) do genoma de *Xanthomonas*. Nesta figura, **A** corresponde a um alinhamento dos mesmos genes encontrados no genoma de *E.coli*, que foram utilizados como referência para nossos alinhamentos em *Xanthomonas* (Neilands, J. B., 1995). Neste alinhamento, os genes de *E.coli* apresentam os seguintes domínios: dois domínios transmembrana - **TM**, um domínio sensorial, um domínio de sinalização e dois domínios de metilação - **MH's**; e **C** corresponde ao mesmo tipo de alinhamento feito com os genes de *Xanthomonas*. **B** corresponde a uma representação da conformação destas proteínas na membrana bacteriana, onde os receptores (em amarelo) promovem o intercâmbio entre o meio externo e o espaço periplasmático. Nesta representação o laranja equívale aos domínios **TM** e o verde aos domínios **MH**. Fica evidente, ao compararmos os dois alinhamentos, que os domínios apresentam-se conservados em ambas as bactérias. O grau de conservação é bastante alto nos domínios de metilação e sinalização. Esta conservação está diretamente ligada ao fato de que a cascata intracelular de sinalização dos eventos que levam ao processo quimiotático são os mesmos, independente do estímulo ao qual foram submetidas. No entanto, ao observarmos o domínio sensorial, este grau de conservação muda em relação a elas. *Xanthomonas* parece ter este domínio mais conservado do que *E.coli* (**D**), isso relaciona-se ao fato de que pelo menos 11 das 20 seqüências de *Xanthomonas* comparadas, estão dispostas em *tandem* no *cluster* 2 de quimiotaxia (ver figura 34 - CDS's em verde sombreadas), mostrando que isso é um clássico evento de duplicação gênica em série. As setas entre as figuras A e C representam pequenas fendas formadas pela diferença entre algumas seqüências. A seta azul, representa uma inserção de **G-XXL-G-XXXX-W-RDXT-A-EVXXE** conservada entre 3 CDS's: Xac1899, Xac3213 e Xac1897 (vermelho - resíduos conservados nas 3 CDS's, azul - conservado em apenas duas e preto - resíduos variáveis). A seta verde indica a inserção da seqüência **RDQIQETSKRIKRL** na CDS Xac3099 que codifica para o gene *PilJ*.

figura 37 – Alinhamento e comparação dos genes *Tsr*'s de *Xanthomonas*. A) Representação dos principais domínios encontrados nas seqüências gênicas que codificam para *Mcp*'s em *Escherichia coli* (Neillands, J. B., 1995); B) Esquema ustrado das MCP's e seus domínios na estrutura celular (detalhes ver texto); C) Idem A porém com os genes de *xanthomonas*, num total de 20; D) "Zoom" do domínio sensorial mais conservado em *Xac*, pelo menos nas 10 primeiras seqüências. Como a filogenia e estrutura do banco de parálogos do genoma de *Xanthomonas* não teve seus *internal names* iterados, abaixo apresenta-se uma conversão das respectivas CDS's relacionadas com eventos de quimiotaxia: 25835 = *ac3132*; 2405 = *Xac1895*; 2394 = *Xac1891*; 25821 = *Xac1893*; 2398 = *Xac1892*; 2423 = *Xac1902*; 25822 = *Xac1894*; 409 = *Xac1896*; 2417 = *Xac1900*; 7779 = *Xac0611*; 2056 = *Xac1666*; 25781 = *Xac3768*; 2415 = *Xac1899*; 10280 = *ac3213*; 2410 = *Xac1897*; 1903 = *Xac2448*; 0488 = *Xac2866*; 2112 = *Xac3449*; 4584 = *Xac3099*; 6812 = *Xac1996*.

Para reforçar ainda mais a idéia de que as CDS's que compreendem o *cluster 2*, relacionadas com a função de *mcp's* dos eventos de quimiotaxia são produtos de uma duplicação gênica, fizemos análises filogenéticas, mediadas por *UPGMA* e *Neighbour joining*; e de agrupamento destes produtos via PCA (*Principal Component Analysis*) (ver figura 38).

Nesta análise observa-se que os genes (representados por pequenos quadrados na análise por PCA) cercados por um arco vermelho, correspondem aos genes que estão em *tandem* no *cluster* dois de quimiotaxia, reforçando ainda mais a conclusão de que as mesmas são produtos de duplicação. Isso é confirmado por *UPGMA*. Onde as barras verticais compreendem os genes que estão envolvidos pelo arco no PCA.

Figura 38 – Análise dos genes que codificam para *Tsr* apresentados na figura anterior como prováveis produtos de duplicação gênica. **A e B)** – Análise por PCA (“principal component analysis”) das seqüências alinhadas na figura 37, em dois diferentes ângulos de visualização. As linhas em amarelo representam os eixos XYZ num plano cartesiano tridimensional. Os círculos coloridos representam *clusters* de genes que apresentam maior similaridade entre si. Estas cores podem ser visualizadas nas árvores C e D, para demonstrar tal grau de conservação. A CDS 4584 (*PilJ*) é a mais distinta entre elas (círculo verde), no entanto, condiz com dados descritos na literatura que flagelos e fimbrias apresentam-se como prováveis complexos que se especiaram no decorrer da evolução, apresentando-se hoje com funções divergentes. **C)** – árvore gerada por *UPGMA*, **D)** – árvore gerada por *Neighbour joining*. Em ambos os casos não há a possibilidade de enraizar a árvore pois necessitamos de uma análise mais complexa.

A diferença no sistema de locomoção entre estas duas bactérias pode estar diretamente relacionado às atividades de degradação de parede celular e vias de infecção do patógeno. *Xylella* não é capaz de infectar o hospedeiro sem a presença do vetor. Automaticamente, não necessita de grandes quantidades de enzimas de degradação de parede nem de um sistema de locomoção. Seu deslocamento no interior do vegetal seria feito pelo próprio fluxo da seiva nos vasos lenhosos. Já *Xanthomonas*, por ser capaz de infectar a planta pelo simples contato com uma região lesada (daí a importância da prevenção da larva minadora dos citros), contém uma maquinaria capaz de romper a rígida parede celular (por isso apresenta inúmeras enzimas com esta função) e ao mesmo tempo um sistema de locomoção próprio sem ter que depender de um vetor específico. *Xanthomonas* é capaz de se locomover sobre uma lâmina d'água, proveniente de chuva ou irrigação, facilitando sua dispersão durante o processo infeccioso. No entanto verifica-se que, ao se alojar no mesófilo acaba perdendo o flagelo.

4.4.9 - Pili / Fímbrias

Para que as bactérias possam se aderir e colonizar um tecido hospedeiro são necessários inúmeros complexos ou polímeros moleculares, entre eles as fímbrias ou pili (pêlo). Apresentam-se subdivididos em várias classes com funções variadas (movimentação, conjugação bacteriana, captação de DNA em bactérias gram positivas, secreção de proteínas extracelulares e até mesmo como variação antigênica) mas com estruturas moleculares similares, dadas por filamentos poliméricos fixados à membrana bacteriana, podendo apresentar tamanhos e diâmetros diferenciados dependendo de sua função específica (Alm, R. A. and Mattick, J.S. 1997).

Dentre estas classes a mais bem descrita refere-se ao tipo IV responsável pelo movimento denominado “twitching motility” sobre a

Figura 39 – Esquema representativo dos genes que participam da biossíntese e regulação de pili em bactérias gram negativas (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000).

superfície de adesão, independentemente da ação flagelar (Bradley, D. E. 1980) (ver figura 39). A classificação IV é devido à sua similaridade na sequência de aminoácidos do polipeptídeo denominado “pilina” e pela conservação de aminoácido N-metilados (fenilalanina ou metionina) como o primeiro aminoácido da subunidade estrutural de “pré-pilina” madura (Strom, M. S. and Lory, S. 1993). Além disso esta classe ainda pode ser dividida em dois subgrupos: no grupo **A** encontramos *Pseudomonas aeruginosa* e *Neisseria gonorrhoea*, entre outros, onde observa-se uma curta sequência de resíduos básicos que servem como precursores de clivagem de enzimas endoproteolíticas entre resíduos invariantes de glicina (G) e fenilalanina (F). O grupo **B** apresenta-se formado por dois membros até o momento “toxin-coregulated pili” (TCP) de *Vibrio cholerae* e as subunidades de “bundle-forming pili” (BFP) de *E. Coli* enteropatogênica.

Xanthomonas e *Xylella* apresentam as CDS's responsáveis pela biogênese de pilina do tipo A. Suas sequências foram alinhadas por programas de múltiplos alinhamentos, e o resultado esta

relatado na figura 40. Utilizamos o gene *FimA* de *Pseudomonas aeruginosa* como base de referência para nossos alinhamentos. De acordo com este alinhamento todas as CDS's, com exceção da Xf0479, apresentam os resíduos de GF invariantes (rosa) para o sítio de clivagem da endopeptidase e a curta sequência de resíduos básicos (assinalados por uma barra horizontal em preto), descritas como características exclusivas do tipo IV grupo A de pilinas. As CDS's Xac2664 e Xf0033 nomeadas como *PilE*, não apresentam um dos dois resíduos de tirosina (30 e 33 em *Pseudomonas aeruginosa*) num domínio hidrofóbico, responsáveis pela interface de dímeros capazes de remontar os filamentos do pili (azul). Estes dois resíduos são expostos por uma dissociação do pili via octil glicosídeo, e só podem ser encontrados nas sequências referidas ao grupo A de classificação (Watts, T. H. et al., 1982).

Figura 40: Alinhamento múltiplo das sequências que compreendem genes relacionados com a biossíntese de “pilina” em *Xylella* (Xf), *Xanthomonas* (Xac) e *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), através do programa ClustalW (Higgins, D.G. and Sharp, P.M. 1988). No dendrograma não enraizado ao lado, observamos que os ramos acabam formando grupos de CDS's que caracterizam eventos de duplicação gênica, devido às suas similaridades. Observe a formação de grupos de parálogos tendo como referência a CDS *FimA* de *Pseudomonas aeruginosa*. Como a filogenia e estrutura do banco de parálogos do genoma de *Xanthomonas* não teve seus *internal names* alterados, abaixo apresenta-se uma conversão das respectivas CDS's relacionadas com eventos de biossíntese de pili: 25207 = Xac3240; 25208 = Xac3241; 25352 = Xac2664.

Quanto a disposição das CDS's no cromossomo, observa-se que a única diferença marcante é a presença de um segundo *operon* que codifica para *FimT-pilV-X-Y1-E* em *Xylella*. Este *operon*

adicional relaciona-se diretamente com número de CDS's para esta função em *Xylella*, como pode ser visualizado, mais uma vez, no alinhamento múltiplo da figura 42.

Xylella possui pelo menos 8 cópias dos genes *FimA* ou *PilE* (e outras 2 com alta similaridade) que codificam para pilina e outras duas com boa similaridade, enquanto *Xanthomonas* possui apenas 3. Em *Xylella* o que se observa é que o operon *pilUT*, *pilS-R-B*-("pilina")₂-*C-D* apresenta-se flanqueado por um fago, e que esta bactéria possui inúmeras cópias do gene que codifica para fimbrilina, em diferentes regiões do genoma. Na maioria das vezes, estas CDS's encontram-se em regiões que poderiam ser consideradas instáveis e susceptíveis a mudanças estruturais (ver figura 41B). Em *Xanthomonas*, os operons que codificam para *pilUT*, *pilS-R-B*-("pilina")₂-*C-D* e *FimT-pilV-X-Y1-E* apresentam-se dispersos entre elementos transponíveis (ver detalhes no tópico fagos e na figura 41A).

Figura 41A – Organização dos operons *pilS-R-B*-("pilina")₂-*C-D* em ambas as bactérias. XFP2 representa um fago, e as CDS's em azul, que flanqueiam este operon em *Xanthomonas*, correspondem a elementos de transposição.

Figura 41B – Organização dos operons *FimT-pilV-X-Y1-E* em ambas as bactérias. No caso de *Xylella* há uma tentativa de se explicar eventos de rearranjos que permitam justificar as duplicações gênicas que ocorreram ao longo da evolução deste organismo.

Em *Xylella*, as fimbrias além de terem a capacidade de promover a união entre as bactérias e transferência de material gênico em eventos de conjugação bacteriana, pode estar diretamente relacionado, juntamente com a biossíntese de goma, na formação de aglomerados bacterianos no entupimento dos vasos lenhosos dos citros, fenômeno este que caracteriza o CVC. Este conglomerado também pode ser observado em culturas de *Xylella in vitro* com baixa aeração. Isso explica o fato de *Xylella* apresentar um número maior de cópias para estes genes em relação a *Xanthomonas*. Isso não significa dizer que esta função não existe para *Xanthomonas*, pois se visualizarmos as fotos abaixo (42 A e B) e o anexo 12, verificaremos que aglomerados bacterianos (grumos) também são vistos em infecções por *Xanthomonas*.

Figura 42A - Formação de aglomerados de *Xylella fastidiosa* no interior do vegetal (xilema), capazes de promoverem o entupimento dos vasos lenhosos e a caracterização da CVC. Observa-se que há a formação de biofilme que, associado à função do pili, promovem esta composição volumosa.
Foto de E. W. Kitajima (ESALQ/USP/Brazil).

Figura 42A - Formação de aglomerados de *Xanthomonas citri* no interior do vegetal (mesófilo foliar). Da mesma forma como se observa em *Xylella*, *Xanthomonas* também é capaz de produzir um biofilme.
Foto de E. W. Kitajima (ESALQ/USP/Brazil).

4.4.10 - Detoxificação

Os genes relacionados ao processo de detoxificação nas bactérias, estão diretamente relacionados ao processo de inativação ou degradação de qualquer composto nocivo ao organismo, como por exemplo os antibióticos. O número total de CDS's relacionadas a esta função em *Xanthomonas* é de 126 CDS's, e em *Xylella* é de 70 CDS's, números bastante elevados em relação ao número de CDS's descritas em *E.coli* K12 (10) e inferior ao número de CDS's para a mesma função em *Pseudomonas aeruginosa* (162).

Quando comparamos os dois fitopatógenos, verificamos que *Xanthomonas*, na maioria das vezes, apresenta um número de CDS's bem superior ao de *Xylella* para uma mesma função (sem levarmos em conta níveis de expressão). Nesta divergência numérica destacam-se as CDS's relacionadas com a resistência à acriflavina (capaz de ligar-se ao DNA atuando como composto mutagênico além de impedir a duplicação celular); CDS's relacionadas com a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos; CDS's relacionadas com a proteção celular por prejuízos causados por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (catalase e superóxido dismutase); CDS's relacionadas com efluxo de compostos como cobalto, zinco, cádmio e cobre; CDS's relacionadas com o metabolismo de glutatona e hemolisinas, e CDS's relacionadas com a biossíntese e tolerância à penicilina.

Além disso, algumas CDS's são exclusivas de cada uma das bactérias. Em *Xanthomonas* destacam-se: duas CDS's que codificam para genes de resistência ao herbicida Biolaphos™ verificada anteriormente em *Streptomyces coelicor* ("phosphinothricyna acetyl transferase"); cinco CDS's relacionadas com um sistema de transporte de membranas que auxilia a secreção de algumas proteínas através do envelope de células gram-negativas. Possui também CDS's que codificam para genes envolvidos com a resistência ao arsenato, bleomicina, entericidina A, metilicina, mitomicina, ácido fusárico, detoxificação de cloroacetaldeído, "carboxylesterase type B" – envolvida na degradação de antibióticos beta lactâmicos, "*ElaA* protein" – envolvida com detoxificação de antibióticos; "gamaglutamyltranspeptidase" – envolvida com a detoxificação de drogas e compostos xenobióticos e "o-methyltransferase" – provavelmente envolvida com a resistência a midecamicina, por ser capaz de catalisar a adição de grupos acetil e propionil na posição 3 do anel de lactona dos antibióticos macrolídeos. Em *Xylella*, o número de CDS's exclusivas relacionadas à esta função é bem menor que em *Xanthomonas*. Destaque para: duas CDS's envolvidas com o metabolismo de ciclohexanos (Xf1726 e 1732) e uma "phenylketoaldehyde dehydrogenase" - envolvida no catabolismo de fenilalanina, mas que apresenta-se em *cluster* junto às duas outras CDS's citadas anteriormente. Três

CDS's envolvidas com a biossíntese de antibióticos peptídicos (2 - “peptide synthase” e 1 - “*PmbA* protein”); poliquetídeo sintase - envolvida na biossíntese de frenolicina e nanaomicina; e genes que codificam para bacteriocina e “daunorubicin C-13 ketoreductase” - envolvida na produção de antibióticos.

Estas divergências indicam que *Xanthomonas* pode apresentar um sistema de adaptação e detoxificação de compostos nocivos mais complexo que *Xylella*, talvez pelo fato de suas localizações no vegetal. Por encontrar-se em um ambiente onde a produção de metabólitos é abundante, *Xanthomonas* desenvolveu um sistema melhor adaptado.

4.4.11 - Sistema de Restrição

O sistema de restrição apresenta-se apenas em organismos unicelulares, principalmente bactérias, cuja função é proteger a célula contra a invasão de DNA extracelular provenientes de outros organismos, como por exemplo bacteriófagos (Redaschi, N. and Bickle, T. A. 1996). Para tanto, é necessário que este sistema consiga distinguir o DNA endógeno do exógeno. Isso se dá por um sistema celular conhecido como modificação da restrição por metilação de resíduos de nucleotídeos adenina e/ou citosina.

Quando comparamos as duas bactérias, encontramos uma divergência bastante grande, no que diz respeito às CDS's que codificam para a função de restrição tanto numericamente quanto fisicamente (distribuição no genoma). *Xanthomonas* apresenta 16 CDS's para esta função, enquanto *Xylella* apresenta 23. Apenas 6 CDS's são homólogas entre elas, entre as quais: “adenine-specific methylase” - envolvida com a metilação de adenina na molécula de DNA, através da reação “S-adenosyl-L-methionine + DNA adenine = S-adenosyl-L-homocysteine + DNA 6-methylaminopurine”; “DNA processing chain A” - provavelmente possui função similar ao gene *DprA* essencial para a transformação de *Helicobacter pylori* (Ando, T. et al, 1999); “site specific DNA methylase” - envolvida na metilação da sequência GANTC em ambas as fitas. Nesta caso, *Xylella* apresenta duas cópias com baixa similaridade entre elas; “Type I restriction modification system DNA methylase” - relacionada com a clássica função R-M (restrição e modificação) de enterobacteriáceas e apresenta similaridade com “DNA methylase”; “Type I restriction modification system endonuclease” - apresenta função de nuclease e ATPase mas não apresenta função de modificação e “Type I restriction

modification system specificity determinant” - atua como endonuclease na presença da subunidade R do complexo. Os três últimos produtos gênicos citados acima são observadas em cópia simples no genoma de *Xanthomonas* e em quadruplicata no genoma de *Xylella*.

Cada bactéria apresenta ainda CDS's com funções específicas. Como é o caso das CDS's que codificam para “antirestriction protein”, “DNA uptake/competence protein”, endonucleases (2 cópias), “cytosine methyltransferase” (2 cópias), e enzimas relacionadas ao tipo II de restrição como por exemplo “restriction enzyme XamI” e “XamI DNA methyltransferase” em *Xanthomonas*. Em *Xylella* as CDS's exclusivas à função de restrição, compreendem apenas 3 cópias de “DNA methyltransferase”, diferentes das encontradas em *Xanthomonas*.

Quanto à distribuição destas CDS's no genoma observa-se que *Xylella* apresenta três cópias de cada uma das CDS's relacionadas com o tipo I de restrição, distribuídas em *clusters* (figura 43). A quarta cópia delas apresentam-se em um outro *operon*, onde duas delas contém mutações pontuais. Em *Xanthomonas* este mesmo *operon* apresenta-se flanqueado por elementos transponíveis, como pode ser visto também com a CDS Xac1059 que codifica para “antirestriction protein” e Xac2437 que codifica para “type II – restriction enzyme XamI” (ver fagos).

Figura 43: Esquema representativo das CDS's relacionadas com o sistema de restrição em *Xylella*. Observa-se que *Xylella* possui um sistema mais complexo em relação ao sistema tipo I de *Xanthomonas*, dado pelas múltiplas cópias de seus respectivos genes. A = “type I - sytem endonuclease”, B = “type I - modification system”, C = “type I - system specificity determinant”, D = “type I - DNA methylase”.

Em resumo, observa-se que *Xylella* possui um número maior de cópias para um mesmo gene, mas ao mesmo tempo não possui uma diversidade tão grande de genes para a função de restrição. Talvez isso seja o fator limitante da entrada de elementos transponíveis em seu genoma. Em contra partida, *Xanthomonas* possui uma maior gama de genes em cópias únicas. Isso poderia estar relacionado à escassez de fagos no seu genoma. Associado a tudo isso, não podemos esquecer que o

ambiente de vida destas bactérias talvez seja o fator preponderante para a inserção destes DNA's exógenos. Sendo assim, poderíamos dizer que bactérias de xilema seriam mais susceptíveis à inserção de fagos, e que bactérias de mesófilo foliar seria mais susceptíveis à inserção de elementos transponíveis, pelo menos em relação à estes dois fitopatógenos comparados.

4.4.12 - Fagos e Elementos Transponíveis

Xylella e *Xanthomonas* apresentam um grande número de seqüências provenientes de DNA exógeno, principalmente fagos e elementos transponíveis. Dentre as 7 CDS's relacionadas com elementos transponíveis em *Xylella*, duas apresentam-se em duplicatas idênticas, como é o caso das CDS's Xf0325 = Xf0535 e Xf0326 = Xf0536. Já *Xanthomonas*, apresenta cerca de 84 CDS's relacionadas com elementos de transposição que podem ser divididos em grupos: **ISxac1** (8) encontradas também em *Xanthomonas campestris*, todas com exatamente 1211 nucleotídeos e idênticas entre si; **ISxac2** (11) e **ISxcd1** (4) encontradas também em *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, com dois tamanhos distintos 263 e 824 nucleotídeos; **ISxac3** (36) encontradas em *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*), com 3 tamanhos distintos: 269, 803 e 815 nucleotídeos; **ISxac4** (4) encontrados em *Desulfovibrio vulgaris*, com tamanhos distintos entre si. Estes cinco grupos de transposases descritos acima encontram-se em fitopatógenos, e parecem ter se replicado no genoma recentemente, pelo fato de ser extremamente conservados entre si. Um sexto grupo poderia ser citado, reunindo todas as CDS's restantes, sem padrão de similaridade.

Quanto aos fagos, *Xylella* apresenta 82 CDS's provenientes dos mais distintos bacteriófagos como por exemplo: P2 (bacteriófago lítico que apresenta baixa frequência de recombinação sem serem afetados pela recombinase **RecA** da bactéria hospedeira (Bertani, G. and Deho, G. 2001), P21 e APSE-1. *Xanthomonas* apresenta 35 CDS's relacionadas com proteínas de fago, mas apenas 7 são diretamente relacionadas ao bacteriófago CTX, as outras relacionam-se com seqüências encontradas em outros organismos. Este fago filamentoso e lisogênico, está diretamente relacionado com o processo de toxicidade em infecções provocadas pela ação de algumas cepas do patógeno *Vibrio cholerae* (Faruque, S.M. et al, 2000).

Dentre os inúmeras regiões do genoma destas bactérias fragmentados pela entrada de DNA exógeno, podemos citar a existência de elementos transponíveis flanqueando todas as CDS's que

5 – Sumário dos resultados

- Ambas possuem 1529 genes BBH, capazes de formar 143 *runs*, classificados da seguinte forma: 65 são encontradas apenas em Xf, Xac e Xcc; 73 são encontrados em outros organismos; 4 são exclusivos de Xf e Xac; e 1 poderia ser classificado também como exclusivo de Xf e Xac, mas apresenta-se como um *run* quimérico (misto) dando similaridade também com *Salmonella typhimurium*;
- *Xanthomonas* apresenta uma maior gama de vias metabólicas;
- *Xanthomonas* apresenta um metabolismo energético que relaciona-se diretamente com suas propriedades de degradar parede celular;
- *Xanthomonas* apresenta um sistema de aquisição de ferro do meio mais complexo, devido ao grande número de genes que codificam para receptores deste composto;
- *Xanthomonas* apresenta a biossíntese de goma relacionada com a concentração de açúcares do meio, enquanto *Xylella* talvez expresse estes genes de forma constitutiva;
- *Xanthomonas* apresenta uma dupla cópia do sistema secretório tipo II que pode facilitar a secreção de proteases e polissacaridases (ausentes no genoma de *Xylella*, provavelmente por perda evolutiva);
- *Xanthomonas* parece ser mais susceptível à inserção de elementos de transposição, enquanto *Xylella* parece ter esta susceptibilidade voltada para inserção de fagos. Estas diferenças provavelmente relacionam-se com seus sistemas de restrição. *Xanthomonas* possui sistema de restrição do tipo II;
- *Xanthomonas* possui flagelo e sistema quimiotático completo, que a permite se deslocar sem a necessidade intrínseca de um vetor;
- *Xanthomonas* possui um maior número de genes com funções regulatórias, relacionados com a própria complexidade metabólica;
- *Xylella* parece ser capaz de sintetizar colicina do tipo V, talvez pelo fato de se localizar no xilema, onde deve disputar com outros endofíticos a eficiência na captação de compostos do meio;
- *Xylella* possui um maior número de cópias de fimbrilina responsável por promover sua adesão nas glândulas salivares do vetor (cigarrinha) e por ser um dos fatores que promove a formação dos grumos no entupimento dos vasos lenhosos do vegetal, caracterizando a CVC.

6 - Discussão

Xylella fastidiosa e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* são gama proteobactérias gram negativas, responsáveis por grandes perdas econômicas no setor citrícola brasileiro. Com seus genomas sequenciados e anotados (Simpson, A.J.G. et al., 2000 e da Silva, et al., 2002), fizemos uma análise comparativa correlacionando suas composições gênicas e seus ambientes de vida. *Xanthomonas* contém quase o dobro do tamanho genômico de *Xylella* (5.2 x 2.7 Mb). No entanto, grande parte de seus genes são comuns e com alto grau de identidade. Isso mostra que ambas apresentam um ancestral em comum, o que condiz com o fato de pertencerem ao grupo das Xanthomoneaceas (Van den Mooter, M. and Swings, J., 1990).

Em relação a estes genes semelhantes, **1526** foram classificadas como tendo a melhor reciprocidade entre as duas bactérias (fortemente ortólogos), ou seja, ao analisarmos as seqüências dos genes de *Xanthomonas* contra o banco de genes do NCBI, o organismo que apresentou a melhor similaridade foi *Xylella*, e vice versa. Portanto, aproximadamente 35% do genoma de *Xanthomonas* é mais similar a 59% do genoma de *Xylella*, do que em relação a qualquer outro organismo.

Os genes que não apresentaram a reciprocidade supracitada, ou possuem uma baixa similaridade quando comparados ou são exclusivos de cada uma delas. Em relação aos genes exclusivos, poderíamos dizer que são fortes candidatos a serem vestígios de um processo evolutivo, relacionado com o fenômeno de especiação e adaptação em seus ambientes de vida. Portanto, são genes que mantiveram-se em um genoma mas que acabaram se perdendo em outro, ou são subprodutos de transferência lateral e inserções de elementos transponíveis e fagos, estes últimos responsáveis, em sua grande maioria, por eventos de rearranjos e mudanças estruturais genômicas (Eisen, J.A., 2000).

Em relação à presença de DNA's exógenos, observamos que *Xanthomonas* apresenta 88 genes (2%) relacionados com elementos de transposição, e outros 43 (1%) relacionados com inserções de fagos. Em contrapartida, *Xylella* apresenta 83 genes (3%) que compreendem seqüências de fagos, e apenas 9 relacionados com elementos de transposição. Estas divergências em relação ao número de genes e tipo de DNA exógeno, pode estar associado ao número e tipo de enzimas envolvidas com eventos de restrição que cada uma possui. Em *Xylella*, observamos um número maior de cópias dos genes **HsdRMS** relacionados com o sistema de restrição e modificação (R-M) (Redaschi, N. and Bickle, T.A., 1996), mas ao mesmo tempo apresenta uma baixa diversidade de funções para este sistema; em contrapartida, *Xanthomonas* possui uma maior diversidade de seus genes, porém em

cópias únicas. Associado a isso, *Xanthomonas* apresenta como peculiaridade genes que compreendem o sistema de restrição do tipo II (*XamI*), não encontrado em *Xylella*.

Além disso, no genoma de *Xylella* encontramos regiões que apresentam características de instabilidade, ou seja, regiões que, parecem ser vestígios de uma inserção remota destes DNA's exógenos, como exemplo a região disposta entre os genes Xf0480 e 0546 e XF2107 e 2132. A grande maioria dos genes que compreendem estas duas regiões, na sua grande maioria, não apresentam funções putativas bem definidas (hipotéticas), ou apresentam similaridades com genes caracterizados como prováveis seqüências de fagos. Outra região interessante está localizada entre os genes Xf1859 e 1885, caracterizada como sendo uma região de duplicação com inversão das seqüências, com características similares aos exemplos anteriores.

Esta comparação também nos forneceu resultados que mostram que *Xylella* pode ter perdido parte de seu genoma durante a evolução como uma forma de adaptar-se ao meio em que vive. No entanto, uma vez ocorrida a perda destes genes, *Xylella* acabou tornando-se limitada ao xilema por não ser capaz de se adaptar em um outro ambiente. Deduzimos isso porque grande parte dos genes que inferem uma maior complexidade metabólica em *Xanthomonas*, na realidade, estão ausentes *Xylella*. Este provável tipo de perda genômica (observada à partir da comparação entre dois organismos de um mesmo grupo), já foram descritos entre bactérias dos gêneros *Rickettsia* (Ogata, H. et al., 2001), *Chlamydia* (Kalman, S. et al., 1999) e *Mycobacterium* (Brosh, R. et al., 2001). Nestes exemplos, foram observados que as diferenças entre as patogenicidades provocadas por estes organismos, e a adaptação dos mesmos em seus nichos, estão relacionados com perdas e/ou ganhos evolutivos do genoma. Um exemplo interessante sobre estes processos adaptativos de ganho e perda de genoma, induzidos por características ambientais, é observado nas bactérias *Borrelia burgdorferi* (Fraser, C. M. et al., 1997) e *Chlamydia trachomatis* (Stephens, R. S. et al., 1998), onde ausentam-se algumas vias de biossíntese de aminoácidos. Estas ausências, de acordo com os autores, não implicam no deficitário desenvolvimento destas bactérias, pois, por serem enteropatógenos e viverem em ambientes que contenham grandes quantidades destes compostos nutricionais, acabaram adaptando-se sem terem a necessidade de sintetizá-los. Estas perdas nas vias de síntese, acabaram influenciando automaticamente num eficiente sistema de captação destes compostos do meio. Portanto, se analisarmos o genoma de *Xylella fastidiosa* da mesma forma, poderíamos afirmar que a ausência de todos os sistemas, citados a seguir, na realidade são frutos de um longo processo evolutivo, que iniciou-se ao se divergir dentro do grupo das Xanthomoneaceas, e que acabou especializando-se num ambiente que dispõe de poucos recursos (xilema) que induziu tal perda.

A complexidade observada no genoma de *Xanthomonas* é caracterizada pela presença de sistemas e vias, inexistentes ou em número reduzido de genes no genoma de *Xylella*, como por exemplo: uma extensa gama de genes de degradação de parede celular e biossíntese de proteases; de inúmeros genes relacionados com funções regulatórias; de um completo metabolismo energético; de um eficiente sistema quimiotático; de todos sistemas secretórios - I, II, III e IV; e de um grande número de genes envolvidos com captação de ferro (65).

A maquinaria de degradação de poli e oligossacarídeos em *Xanthomonas citri* é composta por pelo menos 8 cópias de celulase, 5 cópias de xilanases e xilosidases/arabinosidases, além de inúmeras outras enzimas capazes de degradar celulose e outros compostos que participam da estrutura celular vegetal, e que estão diretamente associados à presença de um completo metabolismo energético. Tudo isso poderia promover uma maior facilidade de se deslocar do meio externo ao interno, de se propagar pelos tecidos vegetais provocando lesões, além de facilitar a sobrevivência durante uma fase de vida livre. No entanto, a atividade de degradação de parede celular vegetal induzida por *Xanthomonas citri* é pequena quando comparada com o mesmo processo em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na podridão negra do repolho (*Brassica Oleraceae*) (Swings, J.G. and Civerolo, E.L., 1993). *Xanthomonas* apresenta o metabolismo central completo com via glicolítica e gliconeogênese, ciclo do TCA, via das pentoses e do glioxilato, além de vias de síntese e degradação de ácidos graxos (da Silva, et al., 2002), diferentemente do observado em *Xylella* onde ausentam-se as CDS's que codificam para as enzimas frutose-1,6-bifosfatase (EC 3.1.3.11) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (EC 4.1.1.32) relacionadas com a gliconeogênese; malato sintase (EC 4.1.3.2) e isocitrato liase (EC 4.1.3.1) relacionadas com a via do glioxilato; glicose-1-desidrogenase (EC 1.1.1.47), gluconolactoquinase (EC 3.1.1.17), gluconoquinase (EC 2.7.1.12), fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44) e transaldolase B (EC 2.2.1.2) relacionadas com a via das pentoses fosfato; além disso, observa-se que *Xylella* não é capaz de degradar ácidos graxos pela ausência dos genes que compreendem a beta oxidação, pelo fato de haver baixas concentrações destes compostos na seiva (Simpson, A.J.G. et al., 2000).

Xanthomonas dispõe de dois sistemas relacionados com o complexo citocromo C oxidase: o primeiro e clássico sistema, formado pelas subunidades codificadas pelos genes *CyoABCDE* (complexo bo3) também presentes em *Xylella*; e o segundo sistema, formado pelos genes *CydAB* (complexo bd), que possui uma alta afinidade por oxigênio (D'mello, R. et al., 1996), ausente em *Xylella*. Curiosamente *Xylella* é o único dentre nove organismo comparados a não possuir este complexo, mas não é o único (dentre os mesmos) a ser considerado fastidioso. Estas diferenças poderiam favorecer *Xanthomonas* no processo conhecido como modularidade dos componentes

respiratórios, sendo capaz de alterar o uso de seus sistemas respiratórios em diferentes condições de crescimento, justificada pela presença dos dois complexos supracitados. Isto implicaria numa maior facilidade de se adaptar em ambientes com distintas concentrações de oxigênio, promovendo uma mínima substituição ou alteração de seu metabolismo para se adaptar a diferentes condições de crescimento, como pode ser visto em *E.coli* e *Bacillus subtilis* (Gennis, R.B. and Stewart, V, 1996).

Observamos também um grande número de genes responsáveis pela captação de compostos ferro quelatados (sideróforos) do meio (63), no genoma de *Xanthomonas*. Em *Xylella* este número está limitado a 5. Como o ferro (usado como cofator de diversas reações enzimáticas e essencial na biossíntese de citocromos) e açúcares simples, são compostos fundamentais para o crescimento bacteriano (Kusel, K., et al., 1999), acreditamos que a provável deficiência no mecanismo de captação de ferro (dado pela baixo número de genes para esta função), associado à falta de um segundo complexo citocromo c oxidase, uma diminuta concentração de açúcares simples na seiva bruta e um metabolismo energético deficiente, poderiam influenciar o processo de duplicação de *Xylella*, tornando-a uma bactéria fastidiosa, mas adaptada ao seu meio ambiente. Tal processo de adaptação é tão grande que talvez toda esta provável perda genômica, seja agora, um fator limitante para sua sobrevivência em um outro nicho que apresente condições diferenciadas em relação ao xilema vegetal.

A presença de todos os sistemas secretórios - I, II, III e IV (sendo o II em duplicata), de um grande número de proteases (92), dos genes envolvidos com processos de patogenicidade, virulência e adaptação (54), associados a um eficiente e completo sistema quimiotático, capaz de locomovê-la até uma abertura natural (estômatos e hidatódios) ou lesão foliar (por intermédio da movimentação de seu único flagelo via lâminas d'água que se formem na superfície foliar), fazem de *Xanthomonas* uma bactéria de grande poder invasivo e de alta patogenicidade e virulência.

Uma grande diferença que pode favorecer *Xylella* no seu processo de colonização e propagação, e que pode ser também um fruto de sua adaptação ao ambiente, é a presença de 8 cópias (contra 3 de *Xanthomonas*) do gene que codifica para pilina em seu genoma. Esta proteína é responsável pela formação das fimbrias mas também pode participar de um processo de locomoção denominado "twitching motility" (Bradley, D. E. 1980). Isso facilitaria seu processo de fixação no vetor (durante o transporte até o vegetal), e a formação de aglomerados celulares (grumos) responsáveis pelo entupimento dos vasos lenhosos, levando às patologias clássicas da doença. Acreditam-se que estes aglomerados celulares são oriundos de uma ação conjunta das fimbrias e da biossíntese de um exopolissacarídeo (EPS), conhecido como goma xanthana, e produzidos única e exclusivamente por fitopatógenos do grupo das Xanthomoneaceas. Em *Xanthomonas campestris* pv.

campestris, já foi descrito que açúcares simples influenciam a expressão dos genes de goma, responsáveis pela produção deste composto (Vojnov, A.A. et al. 2001). Como no xilema há baixas concentrações de açúcares, acreditamos que *Xylella* provavelmente expresse estes genes de forma constitutiva, e não induzida pela concentração de açúcares do meio. É importante citar que o *regulon* de genes *Rpf's*, responsáveis pela expressão dos genes de goma, apresenta-se incompleto e rearranjado no genoma de *Xylella*.

Por todas as características apontadas, *Xanthomonas* poderia ser classificada como uma bactéria mais complexa, e por apresentar esta complexidade requer um controle metabólico mais eficiente. Talvez por isso a mesma apresente uma enorme quantidade de genes relacionados com funções regulatórias, encontrados em menor número no genoma de *Xylella*. Portanto, uma vez em contato com uma porta de entrada (por ação do sistema quimiotático), ativaria seu complexo metabolismo energético, alimentado pela degradação de parede celular e formação de açúcares simples, que automaticamente ativaria a biossíntese de goma. Estes eventos, associados à secreção de proteases e proteínas de virulência (através dos sistemas secretórios), como por exemplo a proteína *PthA* responsável por proliferação e necrose celular, caracterizariam um rápido crescimento e colonização do mesófilo foliar, induzindo como consequência a formação do cancro e a geração dos prejuízos na produção dos citros.

Já *Xylella*, apesar de se apresentar como uma bactéria mais simples, poderia ser considerada um patógeno extremamente adaptado ao ambiente em que vive. Ambiente este que poderia ser considerado inóspito quando comparado ao ambiente de outras bactérias (até mesmo em relação ao ambiente de vida de *Xanthomonas*), por não conter nutrientes dados como essenciais para o desenvolvimento celular. Portanto, para infectar o hospedeiro, necessitaria ser transportada pelo vetor “cigarrinha”, onde ficaria aderida em suas glândulas salivares (por intermédio de suas fimbrias) e, uma vez no interior da planta, teria um crescimento lento induzido por ausência de açúcares no meio ou por uma deficiência na aquisição de ferro. No decorrer de seu crescimento, estaria sintetizando goma constitutivamente, que mais uma vez, associado à função das fimbrias, formaria grumos que entupiriam os vasos xilemáticos do vegetal, caracterizando a CVC.

7 - Referências Bibliográficas

- 1) Abdallah, M.A.. (1991). *Pyoverdins and Pseudobactins*. P.139 – 153. In G. Winkelman (ed.). *Handbook of Microbial Iron Chelates*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- 2) Alberts, B. et al. (1983). *Molecular Biology of The Cell*. Garland. New York. USA. pp 757 – 763.
- 3) Alm, R. A. and Mattick, J. S. (1997). *Genes Involved in the Biogenesis and Function of Type-4 Fimbriae in Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. 192: 89 – 98.
- 4) Altschul, S.F., Madden, T.J., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z. Miler, W. and Lipman, D.J.. *Gapped Blast and PSI-Blast: a New Generation of Protein Databank Search Programs*. *Nucleic Acids Reserch* 25 (17), 3389 - (1997)
- 5) Ando, T. et al.. (1999). *HP0333, a Member of the dprA Family. Is Involved in Natural Transformation in Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 181(18): 5572 - 5580.
- 6) Andrews, A.G. et al.. *Structure of Xanthomonadin I, a Novel Dibrominated Arylpolyene Pigment Produced by the Bacterium Xanthomonas juglandis*. *Tetrahedon Letters*, 45: 4023 – 424. Apud Swings, J.G. and Civerolo, E.L. (1993) *Xanthomonas*. Chapman e Hall, London – UK.
- 7) Bairoch, A. and Apweiler, R. (2000). *The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000* . *Nucleic Acids Res*. 28:45 – 48.
- 8) Baker, B. et al. (1997). *Signalling in Plant-Microbe Interactions*. *Science* (276): 726 – 733.
- 9) Barber, C.E. et al.. (1997). *A Novel Regulatory System Required for Pathogenicity of Xanthomonas campestris is Mediated By a Small Diffusible Signal Molecule*. *Molecular Microbiology*. 24: 555 – 566.
- 10) Benson, D.A. et al.. (2000). *GenBank*. *Nucleic Acids Reserarch*. 28 (1): 15 – 18
- 11) Benson, F.E., Illing, G.T., Sharples, G.J. and Lloyd, R.G.. (1988) *Nucleotide Sequencing of the ruv Region of Escherichia coli K-12 Reveals a LexA Regulated Operon Encoding Two Genes*. *Nucleic Acids Reserch*. 25. 16 (4): 1541 – 1549.
- 12) Bertani, G. and Deho, G. (2001). *Bacteriophage P2: Recombination in the Superinfection Preprophage State and Under Replication Control by Phage P4*. *Mol. Genet. Genomics*. 266(3):406-16
- 13) Blattner, F. R. et al. (1997). *The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K12*. *Science*, vol. 277. 7: 1453-1462

- 14) Borodovsky, M., McIninch, J.D., Koonin, E.V., Rudd, K.E., Medigue, C. and Danchin, A. (1995). *Detection of New Genes in a Bacterial Genome Using Markov Models for Three Gene Classes*. Nucleic Acids Res. 23(17): 3554 – 3562.
- 15) Bradley, D. E. (1980). *A Function of Pseudomonas aeruginosa PAO Pili: Twitching Motility*. Can. J. Microbiol. 26: 146 – 154.
- 16) Braun, V. and Herrmann, C. (1993). *Evolutionary Relationship of Uptake Systems for Biopolymers in Escherichia coli: Cross Complementation Between TonB-ExbB-ExbD and the TolA-TolQ-TolR Proteins*. Molecular Microbiology. 8: 261 – 268.
- 17) Brlansky, R.H., Davis, C.L., Timmer, L.W., Howd, D.S. and Conteras, J.. (1991). *Xylem-Limited Bacteria in Citrus from Argentina with Symptoms of Citrus Variegated Chlorosis*. Phytopathology. 81, 1210.
- 18) Brosh, R. et al. (2001). *The Evolution of Mycobacterial Pathogenicity: Clues from Comparative Genomics*. Trends Microbiology, 9: 452 – 458;
- 19) Coy, M. and Neilands, J. B.. (1991). *Structural Dynamics and Functional Domains of the Fur Protein*. Biochemistry. 30: 8201 - 8210.
- 20) Croft, L. Et al. (2000). *An Interactive Web-Based Pseudomonas aeruginosa Genome Database: Discovery of New Genes, Pathways and Structures*. Microbiology 146 (Pt 10):2351 – 64.
- 21) da Silva, A.C.R et al. (2002). *Comparison of the genomes of two Xanthomonas pathogens with differing host specificities*. Nature 417: 459 – 463..
- 22) Daniels, M. J. and Leach, J. E. (1993). *Genetic of Xanthomonas*. In Swings, J. G. and Civerolo, E. L. (1993). *Xanthomonas*. Chapman & Hall. London – UK.
- 23) Delcher, A.L. et al.. (1999). *Improved Microbial Gene Identification With GLIMMER*. Nucleic Acids Res. 27: 4636 – 4641.
- 24) Denny, T. P. (1995). *Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis*. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 173-197.
- 25) D'mello, R., Hill, S. and Poole, R.K. (1996). *The Cytochrome bd Quinol Oxidase in Escherichia coli Has an Extremely High Oxygen Affinity and Two Oxygen-Binding Haems: Implications for Regulation of Activity in Vivo by Oxygen Inhibition*. Microbiology, 142 (Pt 4): 755 – 63.
- 26) Dow, J. M. and Daniels, M.J. (2000). *Xylella Genomics and Bacterial Pathogenicity to Plants*. Yeast. 17: 263 – 271.
- 27) Eisen, J. A.. (2000). *Horizontal Gene Transfer Among Microbial Genomes: New Insights from Complete Genome Analysis*. Current Opinion in Genetics and Development, 10: 606 – 611;

- 28) Faruque, S. M. et al.. (2000). *Sunlight-Induced Propagation of the Lysogenic Phage Encoding Cholera Toxin*. *Infect. Immun.* 68 (8): 4795 – 4801.
- 29) Fath, M.J., Mahanty, H.K. and Kolter, R.. (1989). *Characterization of a purF Operon Mutation Which Affects Colicin V Production*. *Journal of Bacteriology*. 171 (6): 3158 –3161.
- 30) Fleischmann, R. D. et al.. (1995). *Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of Haemophilus influenzae Rd*. *Science*. 269: 496 – 512.
- 31) Fraser, C. M. et al.. (1997). *Genomic Sequence of a Lyme Disease Spirochaete, Borrelia burgdCDsery*. *Nature*, 11; 390 (6660): 580 – 6;
- 32) Functional Genome of *Xylella fastidiosa* Home Page - <http://watson.fapesp.br.funcional.titulos.htm>
- 33) Fundecitrus Home Page - <http://www.fundecitrus.com.br.cancro.html>.
- 34) Godiard, L., et al. (1994). *Perception and Response in Plant Disease Resistance*. *Current Opinion in Genetics and Development* (4): 662 – 671.
- 35) Goncalves, E.R. and Rosato, Y.B. (2002). *Phylogenetic Analysis of Xanthomonas Species Based Upon 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Sequences*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52: 355 - 361.
- 36) Gordon, D. Et al.. (1998). *Consed: a Graphical Tool for Sequence Finishing*. *Genome Res.* 8: 195 – 202.
- 37) Gottesman, S. and Stout, V.. (1991). *Regulation of Capsular Polysaccharide Synthesis in Escherichia coli K12*. *Mol. Microbiol.* 5: 1599 – 1606.
- 38) Graham, J. E. and Wilkinson, B. J. (1992). *Staphylococcus aureus Osmoregulation: Roles for Choline, Glycine Betaine, Proline, and Taurine*. *Journal of Bacteriology*, apr.: 2711-2716.
- 39) Hara, H. et al.. (2000). *The 4-Oxalomesaconate Hydratase Gene, Involved in the Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway, Is Essential to Vanillate and Syringate Degradation in Sphingomonas paucimobilis SYK-6*. *J. Bacteriology*. 182: 6950 – 6957.
- 40) Higgins,D.G. and Sharp,P.M. (1988) *CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer*. *Gene* 73,237-244.
- 41) Hoheisel, J.D. et al.. (1993). *High Resolution Cosmid and P1 Maps Spanning the 14 Mb Genome of the Fission Yest S. pombe*. *Cell* 73: 109 – 120.
- 42) Hopkins, D.L. (1989). *Xylella fastidiosa: Xylem-Limited Bactèrial Pathogen of Plants*. *Annu. Rev. Phytopathology*, v 27: 271 – 290.
- 43) Kalman, S., et al. (1999). *Comparative Genomes os Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis*. *Nature Genetics*, 21: 385 – 389;

- 44) Kammler, M. et al.. (1993). *Characterization of the Ferrous Iron Uptake System of Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 175 (19): 6212 – 6219.
- 45) Kanehisa, M. and Goto, S.; *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Nucleic Acids Res. 28, 29 - 34 (2000).
- 46) Karp, P.D., Riley, M., Saier, M., Paulsen, I.T., Paley, S. and Pellegrini-Toole, A.(2000) *EcoCyc: Eletronic Encyclopedia of E. coli Genes and Metabolism*. Nucleic Acids Research. 28(1): 56.
- 47) Katzen, F. et al.. (1998). *Xanthomonas campestris pv campestris Gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence*. Journal of Bacteriology. 180: 1607 –1617.
- 48) Kusel, K., et al. (1999). *Microbial Reduction of Fe(III) in Acidic Sediments: Isolation of Acidiphilium cryptum JF-5 Capable of Coupling the Reduction of Fe(III) to the Oxidation of Glucose*. Appl Environ Microbiol, 65 (8): 3633 – 3640.
- 49) Kyrpides, N.C. and Ouzounis, C.A. (1999). *Whole-Genome Sequence Annotation: "Going Wrong With Confidence"*. Molecular Microbiology. 32: 881 – 891.
- 50) Lazdunski, C. J. et al. (1998). *Colicin Import Into Escherichia coli Cells*. Journal of Bacteriology 180(19) Oct. 4993 – 5002.
- 51) Leach, J. E. and White, F. F. (1996). *Bacterial Avirulence Genes*. Annu. Rev. of Phytopathol. (34): 153 – 179.
- 52) Long, S. R. and Staskawicz, B. J. (1993). *Prokaryotic Plant Parasites*. Cell, vol.73, jun. 4: 921-935.
- 53) Lopes, J.R.S. and Baretta, M.J.G. (1996). *A Confirmação da Transmissão por Cigarrinhas do Agente Causal da Clorose Variegada dos Citros, Xylella fastidiosa*. Fitopatologia Brasileira, v 21: 343, suplemento.
- 54) Loprasert, S. et al.. (1993). *Characterization of Ferric Uptake Regulator (fur) Gene from Xanthomonas campestris pv phaseoli With Unusual primary Structure, Genome Organization and Expression patterns*. Gene. 239 (2): 251 – 258.
- 55) Machado, M. (1997). *Citrus Variegated Chlorosis (CVC), a New Destructive Citrus Disease in Brazil, and the Xylem Limited Bactéria, Xylella fastidiosa*. <http://www.dcc.unicamp.br/genoma/xylella.html>.
- 56) Masal, E. et al.. (2000). *Genetic and Biochemical Characterization of 4-Carboxy-2-Hydroxymuconate-6-Semialdehyde Dehydrogenase and Its Role in the Protocatechuate 4,5-Cleavage Pathway in Sphingomonas paucimobilis SYK-6*. J. Bacteriology. 182: 6651 – 6658.

- 57) Matsuyama, S. et al.. (1997). *A Novel Outer Membrane Lipoprotein, LolB (HemM), Involved in the LolA (p20) – Dependent Localization of Lipoproteins to the Outer Membrane of Escherichia coli*. EMBO Journal. 16: 6947 – 6955.
- 58) Menegucci, J.L.P. et al.. (1995). *Alterações Físico-Químicas de Frutos de Laranjeiras Valência com Sintomas de Clorose Variegada dos Citros*. Revista Brasileira de Citricultura, v 17: 153 – 155.
- 59) Mount, D. W. (2001) *Bioinformatics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York – USA.
- 60) Nakai, K. and Kanehisa, M., *Expert system for predicting protein localization sites in Gram-negative bacteria*. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics **11**, 95-110 (1991).
- 61) NCBI Home page: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- 62) Nei, M. and Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York – USA.
- 63) Neidhardt, F.C. et al. (1996). *Escherichia coli and Salmonella: Célular and Molecular Biology*. Second edition. ASM Press. Washington USA. **Section A** : Uptake and Metabolism of Iron and Molybdenum by Earhart, C. F. Chapter 71. **Section A2**: Energy Production, Respiration by Gennis, R.B. and Stewart, V. Chapter 17.
- 64) Neilands, J. B. (1995). *Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds*. The Journal of Biological Chemistry. 270 (45). Nov.: 26723 – 26726.
- 65) Neilands, J. B.. (1982). *Microbial Envelope Proteins Related to Iron*. Annu. Rev. Microbiol. 36: 285 – 309.
- 66) Ogata, H., et al. (2001). *Mechanisms of Evolution in Rickettsia conorii and R. prowazekii*. Science, 293: 2093 – 2098;
- 67) Panina, E.M. et al.. (2001). Comparative Analysis of FUR Regulon in Gamma-roteobacteria. Nucleic Acids Research, 29 (24): 5195 – 5206.
- 68) Paradela, O.F. et al. (1995). *Primeira Constatação em Cafeeiro da Xylella fastidiosa Causadora da Clorose Variegada dos Citros*. Laranja, 16 – Cordeirópolis, SP – Br.
- 69) Plesiat, P. and Nikaido, H.. (1992). *Outer Membranes of Gram-Negative Bacteria Are Permeable to Steroid Probes*. Mol. Microbiol. 6: 1323 – 1333.
- 70) Preston, G.M., Haubold, B. and Rainey, P.B. (1998). *Bacterial Genomics and Adaptation to Life on Plants: Implications for the Evolution of Pathogenicity and symbiosis*. Curr. Opin. Microbiol. 1, 589 – 597.

- 71) Purcell, A.H. and Finlay, A.H. (1979). *Evidence for Noncirculative Transmission of Pierce's Disease Bacterium by Sharpshooter Leafhoppers*. *Phytopathology*, v 69: 393 – 395.
- 72) Purcell, A.H. and Hopkins, D.L.. (1996). *Fastidious Xylem-Limited Bacterial Plant Pathogens*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 131-51.
- 73) Redaschi, N. and Bickle, T.A. (1996). *Posttranscriptional Regulation of EcoP1I and EcoP15I Restriction Activity*. *J. Mol. Biol.* 257(4): 790 – 803.
- 74) Rudolph, K. (1980). *Multiplication of Bacteria in Leaf Tissue*. *Angew. Botanik*, 54, 1 – 9. In Swings, J.G. and Civerolo, E.L. (1993) *Xanthomonas*. Chapman e Hall, London – UK.
- 75) Russel, M. (1998). *Macromolecular Assembly and Secretion Across the Bacterial Cell Envelope: Type II Protein Secretory Systems*. *Journal of Molecular Biology*. 279: 485 – 499.
- 76) Russo, C. A. M. et al. (2001). *Reconstrução Filogenética: Métodos Geométricos*. In Matioli, S. R. (2001). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos. São Paulo – Brasil.
- 77) Ryals, J. et al. (1994). *Systemic Acquired Resistance*. *Plant Physiol.* (104): 1109 – 1112.
- 78) Saito, T et al.. (1991). *Some structural Features of the Iron-Uptake Regulation Protein*. *Eur. J. Biochem.* 197: 29-257.
- 79) Salva, R.A. et al.. (1995). *Situação da Clorose Variegada dos Citros no Estado de São Paulo, Laranja, Cordeirópolis*. v. 16: 155 – 164. Apud: Donnadio, L.C. and Moreira, C.S., coord. *Citrus Variegated Chlorosis*. Bebedouro: FAPESP.FUNDECITRUS, 1998: 166.
- 80) Schwyn, B and Neilands, J.B. (1987). *Universal Chemical Assay for the Detection and Determination os Siderophores*. *Analytical Biochemistry*. 160: 47 – 56.
- 81) Setubal, J.C. and Almeida Jr, N.F.. (2001). *Detection of Related Genes in Procaryotes Using Syntenic Regions*. DIMACS Center, Rutgers University, Piscataway, NJ, March, 2001.
- 82) Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Kimura, S., Iwasaki, H. and Nakata, A.. (1998). *Structure and regulation of the Escherichia coli ruv operon involved in DNA repair and recombination*. *Journal of Bacteriology*. 170 (9): 4322 – 4329.
- 83) Simpson, A.J.G., et al. (2000). *The Genome Sequence of the Plant Pathogen Xylella*. *Nature* 406, 151 – 159.
- 84) Slater, H, et al.. (2000). *A Two-Componet System Involving an HD-GYP Domain Protein Links Cell-Cell Signalling to Pathogenicity Gene Expression in Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology*. 38 (5), 986 – 1003.
- 85) Snel, B., Lehmann, G. Bork, P and Huynen, M. A. (2000). *STRING: A Web-Server to Retrieve and Display the Repeatedly Accruing Neighbourhood of a Gene*. *Nucleic Acids Research*, vol.28, No.18.

- 86) Sonnhammer, E.L.L., Eddy, S.R. and Durbin, R. (1997). *Pfam: A Comprehensive Database of Protein Domain Families Based on Seed Alignments*. *Proteins* 28:405 – 420.
- 87) Staskawicz, B.J. et al. (1995). *Molecular Genetics of Plant Disease Resistance*. *Science* (268): 661 – 666.
- 88) Stephens, R.S., et al.. (1998). *Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: Chlamydia trachomatis*. *Science*, 282: 754 – 759;
- 89) Strom, M. A. and Lory, S. (1993). *Structure-Function and Biogenesis of the Type IV Pili*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 565 – 596.
- 90) Swings, J.G. and Civerolo, E.L. (1993) *Xanthomonas*. Chapman e Hall, London – UK. **Chapter 1:** Hayward, A.C.. The Hosts of *Xanthomonas*; **Chapter 2:** The bacterium *Xanthomonas*;
- 91) Takahagi, M., Iwasaki, H., Nakata, A. and Shinagawa, H.. (1991). *Molecular Analysis of the Escherichia coli ruvC gene. Which Encodes a Holliday Junction-Specific Endonuclease*. *Journal of Bacteriology*. 173 (18): 5747 – 5753.
- 92) Tang, J.L. et al.. (1991). *Genetic and Molecular Analysis of a Cluster of rpf Genes Involved in a Positive Regulation of Synthesis of Extracélular Enzymes and Polysaccharide in Xanthomonas campestris pathovar campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 226: 409 – 417.
- 93) Tatusov, R.L. et al.. (1997). *A genomic perspective on protein families*. *Science*. 278 (5338): 631 – 637;
- 94) Tatusova, T. A. et al.. (1999). *Blast 2 Sequences – A New Tool for Comparing Protein and Nucleotide Sequences*. *FEMS Microbiol Lett.* 174: 247 – 250.
- 95) Timmer, L.W., Garnsey, S.M. and Graham, J.H.. *Compendium of Citrus Diseases*. Second edition. APS PRESS – 2000.
- 96) Vasil, M.L. and Ochaner, U.A. (1999). *The Response of Pseudomonas aeruginosa to Iron: Genetics, Biochemistry and Virulence*. *Molecular Microbiology*. 34(3): 399 – 413.
- 97) Vernooij, B. et al. (1994). *Salicylic Acid As a Signal Molecule in Plant-Pathogen Interactions*. *Current Opinion in Cell Biology* (6): 275 – 279.
- 98) Vojnov, A.A. et al.. (2001). *Expression of the Gum Operon Directing Xanthan Biosynthesis in Xanthomonas campestris and Its Regulation in Plant*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14 (8): 768 – 774.
- 99) Watts, T. H. et al.. (1982). *Dissociation and Characterization of Pilin Isolated From Pseudomonas aeruginosa Strains PAK and PAO*. *Can. J. Biochem.* 60: 867 – 872.
- 100) West, S.C.. (1997). *Processing of Recombination Intermediates by the RuvABC Proteins*. *Annu. Rev. Genet.* 31: 213 – 244.

- 101) Wiggerich, H.G. and Pühler, A. (2000). *The exD2 Gene as Well as the Iron-Uptake Genes tonB, exbB and exbD1 of Xanthomonas campestris pv. Campestris are Essential for the Induction of a Hypersensitive Response on Pepper (Capsicum annuum)*. Microbiology 146: 1053–1060.
- 102) Wiggerich, H.G. et al. (1997). *Unusual Structure of the tonB-exb DNA Region of Xanthomonas campestris pv. Campestris: tonB, exbB, and exbD1 are Essential for Ferric Iron Uptake, But exbD2 Is Not*. Journal of Bacteriology 179 (22): 7103 – 7110.
- 103) Wilson, T.J.G. et al. (1998). *The rpfa Gene of Xanthomonas campestris pathovar campestris, Which Is Involved in the Regulation of Pathogenicity Factor Production, Encodes an Aconitase*. Molecular Microbiology. 28: 961 – 970.
- 104) Xu, Y. et al. (1994). *Plant Defense Genes Are Sinergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate*. The Plant Cell (6): 1077 – 1085.
- 105) Yang, Y. and Gabriel, D. W. (1995). *Xanthomonas Avirulence/Pathogenicity Gene family Encodes Functional Plant Nuclear Targeting Signals*. Mol. Plant-Microbe Interact. (8): 627 – 631.
- 106) Young, G.M., and Postle, K. (1994). *Repression of TonB Transcription During Anaerobic Growth Requires fur Binding at the Promoter and a Second Factor Binding Upstream*. Molecular Microbiology. 11: 943 – 954.

8 – Anexos

Anexo 1 – Interface de anotação das CDS's de *Xanthomonas*

Gene 1012J (LC8/V.A.4) (TRANSLOCATED) Assembly date: 2001-01-01
Start codon changed.
 Only fields in GREEN was updated. Blast, COG, PSORT, PFAM refer to old sequence.
 <<<< Category (C) >>>> <<<< Start Position (411111) >>>>

Product	ATP synthase, C chain
Gene name	atpE or uncE
Chunk	114333332 (23320) (301 bp=101 aa)
TC number	2000
COG	0434PHE-type ATP synthase c subunit/uncE/uncF-type EF-ATPase subunit E (C) (loc: 16)
PFAM	17-45/ATP synthase subunit C

[BLAST](#) | [NCBI](#) | [COG](#) | [PFAM](#) | [PSORT](#)

Accession number	1012J/2001-01-14
Product	ATP synthase, C chain
Gene name	atpE
Organism	Xanthomonas campestris pv. campestris
Identity	100.00%
Coverage query	100.00%
Coverage subject	100.00%
E value	1e-44

Last Edit: 2001-04-12 10:11:11

2001-04-12 10:11:11	jjh
2001-04-12 10:11:11	jjh
2001-11-20 21:27:43	acram
2001-11-20 14:02:30	thomas

Product : ATP synthase, C chain
 Gene Name : atpE or uncE
 TC number :
 Primary Category : LC8
 Secondary Category : V.A.4
 Remarks (256 characters):
 FUNCTION: THIS IS ONE OF THE THREE CHAINS OF NONENZYMATIC COMPONENT (CF(0) SUBUNIT) OF ATPASE COMPLEX
 Notepad:
 FUNCTION: THIS IS ONE OF THE THREE CHAINS OF THE NONENZYMATIC COMPONENT (CF(0) SUBUNIT) OF THE ATPASE COMPLEX. SUBUNIT: F-1 ATPASES HAVE 2 COMPONENTS, CF(1) - THE CATALYTIC CORE - AND THE MEMBRANE PROTON CHANNEL. CF(1) HAS FIVE SUBUNITS: ALPHA BETA(3), GAMMA(1), DELTA(1), EPSILON(1). CF(0) HAS THREE MAIN SUBUNITS: A, B AND C. SUBCELLULAR LOCATION: INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN. MISCELLANEOUS: DICYCLOHEXYLCARBODIMIDE (DCCD) INHI
 Update Notepad
 Branch (RUB) Detection
 Branch/ATP Post Detection BSA Yes
 This record was verified.
☐ By orthologous transfer ☒ By orthologous transfer ☐ By transfer of raw data
☒ Change classification ☐ Insert ☐ Delete with problem

Esquema da interface de anotação do genoma de *Xanthomonas*, criada pelo Dr Paulo Kitajima (UNICAMP). Apresenta um cabeçalho que descreve informações de categorização e posicionamento estrutural da CDS no genoma; uma região de averiguação da CDS por intermédio de ferramentas de bioinformática (amarelo); Região de preenchimento das informações detalhadas pelo anotador, que posteriormente serão convertidas às informações do cabeçalho (laranja).

Anexo 2 - Glicólise e Gliconeogênese

Em verde apresentam-se os genes encontrados em *Xanthomonas citri* com base no banco de dados do Kegg (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000), após publicação do genoma sequenciado. Detalhes destes genes seguem abaixo:

Glicólise

XAC2502	83 % (Q: 98.7 %/S: 98.7 %)	1-phosphofructokinase (fructose 1-phosphate kinase) (fruK) { <i>Xanthomonas campestris</i> }
XAC3438	77 % (Q: 99.8 %/S: 97.7 %)	6-phosphofructokinase (pfkA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1719	87 % (Q: 99.8 %/S: 99.8 %)	enolase (eno) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC3344	89 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	fructose-bisphosphate aldolase { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3070	52 % (Q: 95.9 %/S: 95.6 %)	glucose kinase (glk) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3120	52 % (Q: 94.5 %/S: 95.9 %)	glucose kinase (glk) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2070	77 % (Q: 98.2 %/S: 97.6 %)	glucose kinase (glk) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1788	100 % (Q:100.0 %/S: 89.7 %)	glucose-6-phosphate isomerase (pgi) { <i>Xanthomonas campestris</i> }
XAC3352	82 % (Q: 99.7 %/S: 99.4 %)	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3347	80 % (Q: 99.5 %/S: 77.8 %)	phosphoglycerate kinase (pgk) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2874	77 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	phosphoglycerate mutase (gpm) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1028	74 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	phosphoglycerate mutase (pgmA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3345	84 % (Q: 97.4 %/S: 97.4 %)	pyruvate kinase type II (pykA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2707	71 % (Q: 98.4 %/S: 99.2 %)	triosephosphate isomerase (tpiA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}

Gliconeogênese

XAC0124	68 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	fructose-1,6-bisphosphatase (cbbFC) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3470	88 % (Q: 96.6 %/S: 99.6 %)	NADP-dependent malic enzyme (maeB) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2041	86 % (Q: 99.7 %/S: 98.9 %)	phosphoenolpyruvate synthase (ppsA or pps) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}

Complexo piruvato desidrogenase

XAC3661	67 % (Q:101.4 %/S:108.9 %)	dihydrolipoamide acetyltransferase (phdB) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0443	41 % (Q: 70.7 %/S: 96.5 %)	dihydrolipoamide acyltransferase (pdhB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3659	75 % (Q:100.7 %/S:101.3 %)	dihydrolipoamide dehydrogenase (lpdA or lpd) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0576	85 % (Q:100.1 %/S: 91.0 %)	pyruvate dehydrogenase (aceE) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0224	66 % (Q: 99.1 %/S: 99.5 %)	pyruvate dehydrogenase (poxB) { <i>Yersinia pestis</i> }
XAC0446	50 % (Q: 96.7 %/S: 95.9 %)	pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit (pdhA) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0445	61 % (Q: 96.3 %/S: 94.6 %)	pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit (pdhB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }

Respiração anaeróbica (fermentação)

XAC2826	72 % (Q: 97.2 %/S:100.0 %)	alcohol dehydrogenase { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC0201	39 % (Q: 99.7 %/S: 99.1 %)	alcohol dehydrogenase (adh) { <i>Mesorhizobium loti</i> }
XAC0734	87 % (Q:100.0 %/S: 99.2 %)	alcohol dehydrogenase C { <i>Salmonella typhimurium</i> LT2}
XAC0652	65 % (Q:100.3 %/S: 97.9 %)	alcohol dehydrogenase class III (adhC) { <i>Yersinia pestis</i> }
XAC0762	72 % (Q: 99.6 %/S: 99.6 %)	D-lactate dehydrogenase (dld) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2486	60 % (Q: 95.9 %/S: 95.2 %)	formate dehydrogenase a chain { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC2487	53 % (Q: 90.4 %/S: 88.2 %)	formate dehydrogenase b chain (fdxC or fdhD) { <i>Ralstonia eutropha</i> }
XAC0364	71 % (Q: 98.6 %/S:100.0 %)	glutaconate CoA transferase subunit A (gctA) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0365	72 % (Q: 98.5 %/S: 99.2 %)	glutaconate CoA transferase subunit B (gctB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0133	88 % (Q: 97.2 %/S: 99.0 %)	L-lactate dehydrogenase (ldtD) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }

Anexo 3 - Ciclo de Krebs – TCA

Em verde apresentam-se os genes encontrados em *Xanthomonas citri* com base no banco de dados do Kegg (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000), após publicação do genoma sequenciado. Detalhes destes genes seguem abaixo:

Ciclo do TCA

XAC1139	82 % (Q:100.6 %/S: 99.9 %)	aconitate hydratase 1 (acnA) { <i>Ralstonia eutropha</i> }
XAC1885	88 % (Q:100.5 %/S: 97.9 %)	aconitate hydratase 2 (acnB) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC3388	89 % (Q: 99.8 %/S: 99.8 %)	citrate synthase (glutA) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC1533	85 % (Q:100.0 %/S: 97.6 %)	dihydrolipoamide dehydrogenase (ldp) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC1534	80 % (Q:100.0 %/S:103.1 %)	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (sucB) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC1542	77 % (Q: 99.8 %/S: 98.5 %)	fumarate hydratase (fumC) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC1460	87 % (Q: 99.4 %/S: 91.1 %)	fumarate hydratase (fumB) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC3835	80 % (Q: 99.3 %/S: 97.1 %)	isocitrate dehydrogenase (icd) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC1046	89 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	isocitrate dehydrogenase (icd) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC1006	85 % (Q: 99.7 %/S: 97.6 %)	malate dehydrogenase (mdh) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC1535	82 % (Q: 98.6 %/S: 98.6 %)	oxoglutarate dehydrogenase (odhA) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC0806	38 % (Q:103.4 %/S:100.8 %)	phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc) { <i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i> }
XAC2078	90 % (Q:100.4 %/S:100.0 %)	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein (sdhB) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC2077	91 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit (sdhA or rpl28) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC2075	58 % (Q:100.0 %/S: 92.3 %)	succinate dehydrogenase, membrane anchor subunit (sdhC) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC2076	75 % (Q: 98.4 %/S: 99.2 %)	succinate dehydrogenase, membrane anchor subunit (sdhD) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC3235	91 % (Q:100.0 %/S:100.3 %)	succinyl-CoA synthetase, alpha subunit (sucD) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC3236	81 % (Q: 99.0 %/S: 99.5 %)	succinyl-CoA synthetase, beta subunit (sucC) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }

Anexo 4 - Via do Glioxilato

Em verde apresentam-se os genes encontrados em *Xanthomonas citri* com base no banco de dados do Kegg (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000), após publicação do genoma sequenciado. Detalhes destes genes seguem abaixo:

Via do Glioxilato

[XAC0257](#) 76 % (Q: 97.0 %/S: 90.1 %)

[XAC0256](#) 55 % (Q: 97.8 %/S: 97.2 %)

isocitrate lyase ([aceA](#)) {*Deinococcus radiodurans*}

malate synthase ([mls](#)) {*Myxococcus xanthus*}

Oxidativa

XAC0680	54 % (Q: 96.8 %/S:100.0 %)	6-phosphogluconate dehydrogenase (gndA) { <i>Methylobacillus flagellatus</i> }
XAC2069	65 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	6-phosphogluconolactonase (pgl) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC1633	44 % (Q: 97.7 %/S: 81.5 %)	glucose dehydrogenase (gcd) { <i>Salmonella enterica sp. enterica serovar Typhi</i> }
XAC3212	41 % (Q: 98.8 %/S:102.4 %)	glucose dehydrogenase (gcd) { <i>Escherichia coli O157:H7 EDL933</i> }
XAC4081	44 % (Q: 83.3 %/S: 99.6 %)	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (zwf) { <i>Chlamydophila pneumoniae</i> }
XAC2071	79 % (Q:100.2 %/S:100.0 %)	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (zwf) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }

Não oxidativa

XAC0472	81 % (Q:100.0 %/S: 93.3 %)	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase (rpe or dod) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC3411	80 % (Q: 93.9 %/S: 88.2 %)	ribose-5-phosphate isomerase A (rpiA) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC0902	59 % (Q: 97.8 %/S: 98.1 %)	transaldolase B (talB) { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC3372	81 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	transketolase 1 (tktA or tkt) { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }

Anexo 6 - Biossíntese de Ácidos Graxos

Em verde apresentam-se os genes encontrados em *Xanthomonas citri* com base no banco de dados do Kegg (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000), após publicação do genoma sequenciado. Detalhes destes genes seguem abaixo:

Biossíntese de ácidos gráxos e ácidos fosfatídicos

XAC1410	73 % (Q: 100.0 %/S: 95.0 %)	(3r)-hydroxymyristoyl ACP dehydrase (fabZ) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1722	74 % (Q: 95.2 %/S: 89.8 %)	2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (ispF) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC0353	74 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	3- α -hydroxysteroid dehydrogenase (drb0080) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1584	44 % (Q: 98.5 %/S: 98.1 %)	3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (crt) { <i>Clostridium acetobutylicum</i> }
XAC2129	32 % (Q: 98.9 %/S: 99.2 %)	3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) { <i>Bacillus subtilis</i> }
XAC0433	38 % (Q: 98.8 %/S: 98.8 %)	3-oxoacyl-[ACP] reductase (fabG) { <i>Bacillus halodurans</i> }
XAC4090	74 % (Q: 99.6 %/S: 96.4 %)	3-oxoacyl-[ACP] reductase (fabG) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1127	74 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	3-oxoacyl-[ACP] reductase (fabG) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1963	46 % (Q: 85.8 %/S: 99.5 %)	3-oxoacyl-[ACP] reductase (fabG) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1964	84 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	3-oxoacyl-[ACP] synthase (fabH) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1129	86 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	3-oxoacyl-[ACP] synthase II (fabF) { <i>Xanthomonas albilineans</i> }
XAC2571	83 % (Q: 100.0 %/S: 76.3 %)	3-oxoacyl-[ACP] synthase III (fabH) { <i>Xanthomonas campestris</i> }
XAC0233	82 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	3-oxoacyl-[ACP] synthase III (fabH) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1721	73 % (Q: 86.5 %/S: 99.6 %)	4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase (ispD) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC2401	54 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	acetoacetyl-CoA reductase (phbB) { <i>Ralstonia eutropha</i> }
XAC3486	87 % (Q: 99.6 %/S: 99.6 %)	acetoacetyl-CoA reductase (phbB) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1348	59 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	acetoacetyl-CoA thiolase (atoB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC4179	81 % (Q: 99.7 %/S: 99.7 %)	acetyl coenzyme A synthetase (acs) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1405	81 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (accA) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC2715	82 % (Q: 100.0 %/S: 99.0 %)	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase (accD) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC3773	51 % (Q: 92.6 %/S: 97.1 %)	acyl carrier phosphodiesterase-like protein { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC4101	91 % (Q: 77.3 %/S: 90.2 %)	acyl carrier protein (acpC) { <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> }
XAC1128	97 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	acyl carrier protein (acpP) { <i>Xanthomonas albilineans</i> }
XAC1965	83 % (Q: 95.9 %/S: 95.9 %)	acyl carrier protein (acp) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1654	53 % (Q: 104.7 %/S: 100.0 %)	acyl carrier protein phosphodiesterase (acpD) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0264	76 % (Q: 97.4 %/S: 97.2 %)	acyl-CoA carboxyltransferase beta chain (accD) { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC2756	53 % (Q: 94.5 %/S: 95.1 %)	acyl-CoA thioester hydrolase { <i>Vibrio cholerae</i> }
XAC0833	57 % (Q: 88.0 %/S: 91.0 %)	acyl-CoA thioesterase I (tesA) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0560	79 % (Q: 101.3 %/S: 99.1 %)	alpha subunit of malonate decarboxylase (mdcA) { <i>Burkholderia cepacia</i> }
XAC3623	77 % (Q: 100.6 %/S: 99.4 %)	beta-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase (fabA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3625	65 % (Q: 100.0 %/S: 99.3 %)	beta-ketoacyl-[ACP] synthase I (fabB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC4086	72 % (Q: 99.7 %/S: 99.7 %)	beta-ketoacyl-[ACP] synthase II (fabF or fabJ) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1123	83 % (Q: 100.0 %/S: 100.3 %)	beta-ketoacyl-[ACP] synthase III (fabH) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0532	76 % (Q: 100.0 %/S: 101.2 %)	biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA carboxylase (bccP) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC0263	54 % (Q: 98.1 %/S: 93.4 %)	biotin carboxylase (accC or fabG) { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC0530	92 % (Q: 99.3 %/S: 96.4 %)	biotin carboxylase subunit of acetyl CoA carboxylase (accC) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC4153	76 % (Q: 98.7 %/S: 99.6 %)	cardiolipin synthase (cls) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0195	64 % (Q: 100.0 %/S: 103.1 %)	cardiolipin synthase (cls) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0014	37 % (Q: 99.8 %/S: 96.4 %)	cardiolipin synthetase (cls) { <i>Bacillus firmus</i> }
XAC0514	59 % (Q: 99.0 %/S: 96.2 %)	CDP-alcohol phosphatidyltransferase (pgsA) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0519	38 % (Q: 89.6 %/S: 86.0 %)	CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase-related protein (pgsA) { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC0561	59 % (Q: 91.4 %/S: 88.9 %)	delta subunit of malonate decarboxylase (mdcD) { <i>Burkholderia cepacia</i> }
XAC4096	94 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	fatty acyl CoA synthetase { <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> }
XAC0566	46 % (Q: 99.0 %/S: 100.3 %)	malonyl CoA-ACP transacylase (mdcH) { <i>Burkholderia cepacia</i> }
XAC1126	75 % (Q: 99.4 %/S: 98.4 %)	malonyl CoA-ACP transacylase (fabD) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0238	72 % (Q: 97.6 %/S: 98.8 %)	NAD(P)H steroid dehydrogenase (cdh) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0883	78 % (Q: 98.5 %/S: 98.5 %)	p-hydroxycinnamoyl CoA hydratase/lyase (fadB) { <i>Caulobacter crescentus</i> }
XAC1416	68 % (Q: 103.3 %/S: 100.0 %)	phosphatidate cytidyltransferase (cdsA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2728	75 % (Q: 99.6 %/S: 95.2 %)	phosphatidylserine decarboxylase (dpsD) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2048	59 % (Q: 98.6 %/S: 99.4 %)	poly (3-hydroxybutyric acid) synthase (phbC) { <i>Allochrocatium vinosum</i> }

Degradação de Ácidos Graxos

XAC1318	36 % (Q:101.2 %/S: 96.8 %)	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (fadB) { <i>Vibrio cholerae</i> }
XAC2013	37 % (Q:103.1 %/S:102.1 %)	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (fadB) { <i>Bacillus halodurans</i> }
XAC1850	58 % (Q: 96.9 %/S: 97.3 %)	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type II (hadH2) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2012	54 % (Q: 98.5 %/S: 99.0 %)	3-ketoacyl-CoA thiolase (fadA) { <i>Deinococcus radiodurans</i> }
XAC1562	48 % (Q: 98.4 %/S: 98.9 %)	acyl-CoA dehydrogenase (acdA) { <i>Bacillus halodurans</i> }
XAC2563	58 % (Q:100.2 %/S:100.0 %)	acyl-CoA dehydrogenase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1313	62 % (Q: 95.2 %/S: 96.6 %)	acyl-CoA dehydrogenase (fadE9) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3054	52 % (Q:100.4 %/S:101.6 %)	acyl-CoA dehydrogenase { <i>Vibrio cholerae</i> }
XAC0265	75 % (Q: 99.7 %/S: 99.7 %)	acyl-CoA dehydrogenase (acdA or acd) { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC0213	60 % (Q:100.2 %/S:101.4 %)	acyl-CoA thiolase (yfeY) { <i>Moritella marina</i> }
XAC1853	47 % (Q: 94.3 %/S: 94.3 %)	enoyl-CoA hydratase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1315	45 % (Q: 99.7 %/S:104.4 %)	enoyl-CoA hydratase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1314	65 % (Q: 95.5 %/S: 93.0 %)	enoyl-CoA hydratase (paalF) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }

Anexo 8 - Metabolismo de Enxofre

Em verde apresentam-se os genes encontrados em *Xanthomonas citri* com base no banco de dados do Kegg (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000), após publicação do genoma seqüenciado. Detalhes destes genes seguem abaixo:

Metabolismo de enxofre

XAC3332	75 % (Q:100.0 %/S:101.7 %)	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase (cysH) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3329	82 % (Q: 98.0 %/S: 93.4 %)	ATP sulfurylase, small subunit (cysD or nodP) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3328	73 % (Q: 98.2 %/S: 97.9 %)	ATP sulfurylase/adenylylsulfate kinase (nodQ) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3330	71 % (Q:100.2 %/S:100.7 %)	NADPH-sulfite reductase, flavoprotein subunit (cysI) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3331	79 % (Q: 98.8 %/S: 95.7 %)	NADPH-sulfite reductase, iron-sulfur protein (cysI) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2948	47 % (Q: 96.3 %/S:109.5 %)	sulfite reductase { <i>Caulobacter crescentus</i> }
XAC3066	66 % (Q: 99.6 %/S: 95.6 %)	sulfite synthesis pathway protein (cysQ) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0830	67 % (Q: 98.3 %/S: 95.3 %)	taurine dioxygenase (tauD or ssiD) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1587	48 % (Q: 97.6 %/S: 99.6 %)	thiosulfate sulfurtransferase (sseA) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }

Fosforilação Oxidativa

XAC3887	71 % (Q: 97.8 %/S: 98.5 %)	cytochrome C oxidase, polypeptide I (ctaD or coxA) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3888	54 % (Q: 78.0 %/S: 68.4 %)	cytochrome C oxidase, polypeptide II (ctaC or coxB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3884	56 % (Q: 103.1 %/S: 101.7 %)	cytochrome C oxidase, polypeptide III (cox3) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2336	64 % (Q: 95.4 %/S: 99.0 %)	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I (cydA) { <i>Caulobacter crescentus</i> }
XAC2337	65 % (Q: 97.4 %/S: 96.9 %)	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II (cydB) { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC1259	82 % (Q: 100.0 %/S: 99.1 %)	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit I (cyoB) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1258	67 % (Q: 101.9 %/S: 99.4 %)	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit II (cyoA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1260	84 % (Q: 92.8 %/S: 95.5 %)	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit III (cyoC) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1261	66 % (Q: 97.3 %/S: 95.6 %)	cytochrome O ubiquinol oxidase, subunit IV (cyoD) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3822	57 % (Q: 94.7 %/S: 96.4 %)	NADH dehydrogenase (ndh) { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC2172	39 % (Q: 88.1 %/S: 89.3 %)	NADH dehydrogenase { <i>Vibrio cholerae</i> }
XAC2699	89 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO1 subunit (nuoF) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2695	80 % (Q: 94.5 %/S: 93.7 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO10 subunit (nuoJ) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2694	93 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO11 subunit (nuoK) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2693	79 % (Q: 102.0 %/S: 102.1 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO12 subunit (nuoL) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2692	86 % (Q: 100.2 %/S: 100.0 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO13 subunit (nuoM) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2691	79 % (Q: 100.0 %/S: 100.2 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO14 subunit (nuoN) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2700	83 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO2 subunit (nuoE) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2698	80 % (Q: 99.9 %/S: 99.9 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO3 subunit (nuoG) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2701	88 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO4 subunit (nuoD) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2702	74 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO5 subunit (nuoC) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2703	92 % (Q: 99.5 %/S: 99.5 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO6 subunit (nuoB) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2704	87 % (Q: 100.0 %/S: 87.4 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO7 subunit (nuoA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2697	90 % (Q: 100.0 %/S: 99.1 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO8 subunit (nuoH) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2696	95 % (Q: 100.0 %/S: 99.4 %)	NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO9 subunit (nuoI) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2983	53 % (Q: 94.9 %/S: 98.9 %)	quinol oxidase, subunit I { <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhi</i> }
XAC2982	52 % (Q: 98.2 %/S: 99.1 %)	quinol oxidase, subunit II (qxtB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2456	74 % (Q: 100.0 %/S: 99.8 %)	ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome B sub(petB) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC2455	62 % (Q: 97.2 %/S: 94.9 %)	ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, cytochrome C1 sub(petC) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC2457	70 % (Q: 94.4 %/S: 96.2 %)	ubiquinol cytochrome C oxidoreductase, iron-sulfur subunit (petA) { <i>Xylella fastidiosa</i> }

Transporte de elétrons

XAC1290	39 % (Q: 95.5 %/S: 97.2 %)	2-nitropropane dioxygenase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0031	66 % (Q: 98.0 %/S: 98.9 %)	alcohol dehydrogenase (yahK) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2896	43 % (Q: 100.3 %/S: 99.4 %)	alcohol dehydrogenase { <i>Mesorhizobium loti</i> }
XAC3747	72 % (Q: 100.3 %/S: 100.0 %)	alcohol dehydrogenase (Zn-dependent) (ybdR) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1808	88 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	aldehyde dehydrogenase { <i>Flavobacterium lutescens</i> }
XAC0882	45 % (Q: 96.9 %/S: 98.3 %)	aldehyde dehydrogenase (badH) { <i>Rhodococcus rhodochrous</i> }
XAC0492	61 % (Q: 85.5 %/S: 79.7 %)	bacterioferritin-associated ferredoxin { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1676	57 % (Q: 97.1 %/S: 97.9 %)	C-type cytochrome biogenesis membrane protein (cyoK) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2328	68 % (Q: 99.5 %/S: 99.4 %)	C-type cytochrome biogenesis membrane protein (cyoK) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1674	47 % (Q: 100.0 %/S: 92.3 %)	C-type cytochrome biogenesis protein (cyoL) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1677	45 % (Q: 94.9 %/S: 98.0 %)	C-type cytochrome biogenesis protein (cyoJ) { <i>Pseudomonas fluorescens</i> }
XAC2331	50 % (Q: 59.3 %/S: 93.9 %)	C-type cytochrome biogenesis protein (cyoH) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2330	56 % (Q: 95.1 %/S: 95.1 %)	C-type cytochrome biogenesis protein (cyoL) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2327	62 % (Q: 93.6 %/S: 95.4 %)	C-type cytochrome biogenesis protein (cyoJ) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0534	61 % (Q: 101.0 %/S: 102.1 %)	C-type cytochrome biogenesis protein (copper tolerance) (dsbD) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC1675	46 % (Q: 100.0 %/S: 91.4 %)	C-type cytochrome biogenesis protein/thioredoxin (dsbE or ccmG) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC2329	59 % (Q: 97.5 %/S: 99.0 %)	C-type cytochrome biogenesis protein/thioredoxin (dsbE or ccmG) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
XAC3735	54 % (Q: 98.9 %/S: 99.4 %)	cyanide insensitive terminal oxidase (cioA) { <i>Salmonella enterica</i> <i>enterica</i> ser. <i>typhi</i> }
XAC3736	49 % (Q: 97.6 %/S: 99.1 %)	cyanide insensitive terminal oxidase (cioB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3033	65 % (Q: 96.3 %/S: 95.7 %)	cytochrome B561 (yodB) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3991	40 % (Q: 91.7 %/S: 92.7 %)	cytochrome B561 (yodB) { <i>Rhodobacter sphaeroides</i> }
XAC1685	25 % (Q: 109.6 %/S: 100.4 %)	cytochrome C { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> }
XAC4182	27 % (Q: 71.4 %/S: 74.5 %)	cytochrome C biogenesis protein { <i>Deinococcus radiodurans</i> }
XAC3879	84 % (Q: 98.3 %/S: 96.7 %)	cytochrome C oxidase assembly factor (coxD) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3885	42 % (Q: 81.3 %/S: 87.5 %)	cytochrome C oxidase assembly protein ctaG (cox11) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }

XAC1684	43 % (Q: 95.6 %/S: 97.3 %)	cytochrome C2 (<i>cycA</i>) { <i>Crithidia oncopelti</i> }
XAC0724	44 % (Q: 82.1 %/S: 96.2 %)	cytochrome C4 (<i>cycA</i>) { <i>Azotobacter vinelandii</i> }
XAC0273	38 % (Q: 66.9 %/S: 41.2 %)	cytochrome C5 { <i>Neisseria meningitidis</i> Z2491}
XAC2062	51 % (Q: 56.7 %/S: 86.4 %)	cytochrome C552 (<i>cycM</i>) { <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> }
XAC3425	44 % (Q: 86.5 %/S: 45.2 %)	cytochrome C6 { <i>Deinococcus radiodurans</i> }
XAC1686	38 % (Q: 97.1 %/S: 92.3 %)	cytochrome like B561 { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2549	51 % (Q: 94.5 %/S: 97.6 %)	D-amino acid oxidase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2045	45 % (Q: 103.2 %/S: 85.2 %)	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase (<i>hbdH1</i>) { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC2122	22 % (Q: 99.3 %/S: 82.4 %)	dehydrogenase { <i>Deinococcus radiodurans</i> }
XAC1377	44 % (Q: 98.1 %/S: 95.8 %)	dehydrogenase { <i>Vibrio cholerae</i> }
XAC0322	45 % (Q: 99.7 %/S: 100.0 %)	dehydrogenase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3868	44 % (Q: 96.4 %/S: 100.5 %)	dehydrogenase (<i>ylil</i>) { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC2708	49 % (Q: 97.4 %/S: 97.4 %)	dehydrogenase { <i>Caulobacter crescentus</i> }
XAC1481	27 % (Q: 63.6 %/S: 64.8 %)	dehydrogenase { <i>Streptomyces galilaeus</i> }
XAC3587	95 % (Q: 99.7 %/S: 99.7 %)	electron transfer flavoprotein alpha subunit (<i>etfA</i>) { <i>Xanthomonas campestris campestris</i> }
XAC3586	97 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	electron transfer flavoprotein beta subunit (<i>etfB</i> or <i>etfS</i>) { <i>Xanthomonas campestris</i> }
XAC3422	67 % (Q: 100.7 %/S: 99.3 %)	electron transfer protein azurin I (<i>az1</i>) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1927	25 % (Q: 91.6 %/S: 75.4 %)	Fe-S oxidoreductase (<i>aslB</i>) { <i>Pseudomonas putida</i> }
XAC2524	78 % (Q: 90.4 %/S: 97.7 %)	ferredoxin { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1189	68 % (Q: 77.1 %/S: 87.1 %)	ferredoxin { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0236	80 % (Q: 98.4 %/S: 98.4 %)	ferredoxin (<i>ykgJ</i>) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1384	78 % (Q: 87.5 %/S: 92.5 %)	ferredoxin II (<i>ydgM</i>) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1458	79 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	ferredoxin-NADP reductase (<i>fpr</i>) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3575	77 % (Q: 98.2 %/S: 98.4 %)	flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase (<i>etf-QO</i>) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC4156	68 % (Q: 98.3 %/S: 96.9 %)	FldA protein (<i>fldA</i>) { <i>Sphingomonas</i> sp. LB126}
XAC0321	50 % (Q: 97.0 %/S: 96.5 %)	FMN oxidoreductase (<i>fpr</i>) { <i>Mesorhizobium loti</i> }
XAC2028	56 % (Q: 100.3 %/S: 100.3 %)	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase (<i>fdh</i>) { <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120}
XAC1362	62 % (Q: 98.4 %/S: 98.9 %)	GTN reductase (<i>nerA</i>) { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC0189	50 % (Q: 100.2 %/S: 102.8 %)	indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase chain alpha (<i>iorA</i> or <i>AF1489</i>) { <i>Mesorhizobium loti</i> }
XAC2546	43 % (Q: 95.2 %/S: 97.0 %)	ketoglutarate semialdehyde dehydrogenase { <i>Caulobacter crescentus</i> }
XAC0855	48 % (Q: 94.7 %/S: 98.1 %)	monooxygenase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2229	58 % (Q: 97.5 %/S: 92.8 %)	NAD(P)H dehydrogenase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0088	58 % (Q: 94.9 %/S: 72.1 %)	NAD(P)H oxidoreductase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2569	50 % (Q: 99.4 %/S: 99.1 %)	NAD(P)H steroid dehydrogenase (<i>odh</i>) { <i>Yersinia pestis</i> }
XAC0462	54 % (Q: 97.7 %/S: 98.6 %)	NADH dehydrogenase subunit 5 (<i>ndhF</i>) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0334	54 % (Q: 88.2 %/S: 92.5 %)	NADH-dependent FMN reductase (<i>slfA</i>) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0851	66 % (Q: 100.0 %/S: 100.5 %)	NADH-dependent FMN reductase (<i>slfA</i>) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2035	67 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	non-heme chloroperoxidase (<i>cpo</i> OR <i>cpoF</i>) { <i>Pseudomonas fluorescens</i> }
XAC1338	36 % (Q: 91.0 %/S: 91.7 %)	oxidoreductase { <i>Mesorhizobium loti</i> }
XAC0440	61 % (Q: 99.6 %/S: 99.6 %)	oxidoreductase { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC2481	43 % (Q: 97.0 %/S: 99.5 %)	oxidoreductase (<i>ordL</i>) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3676	49 % (Q: 94.4 %/S: 98.4 %)	oxidoreductase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3919	80 % (Q: 100.0 %/S: 100.0 %)	oxidoreductase { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3710	63 % (Q: 99.7 %/S: 99.7 %)	oxidoreductase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3400	77 % (Q: 98.7 %/S: 99.2 %)	oxidoreductase { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0339	64 % (Q: 99.7 %/S: 99.3 %)	oxidoreductase { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1845	76 % (Q: 96.0 %/S: 99.8 %)	oxidoreductase { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC0831	37 % (Q: 99.6 %/S: 99.3 %)	oxidoreductase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1011	54 % (Q: 100.3 %/S: 101.2 %)	oxidoreductase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2713	51 % (Q: 97.5 %/S: 99.7 %)	oxidoreductase { <i>Caulobacter crescentus</i> }
XAC4186	58 % (Q: 94.1 %/S: 91.3 %)	oxidoreductase (<i>ucpA</i>) { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC4184	40 % (Q: 99.7 %/S: 99.1 %)	oxidoreductase { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC2548	51 % (Q: 96.3 %/S: 101.0 %)	oxidoreductase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0681	53 % (Q: 94.6 %/S: 92.5 %)	oxidoreductase (<i>ydgJ</i>) { <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933}
XAC0738	48 % (Q: 100.0 %/S: 101.5 %)	oxidoreductase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC4364	81 % (Q: 100.0 %/S: 99.7 %)	oxidoreductase { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC1212	53 % (Q: 95.1 %/S: 96.1 %)	oxidoreductase { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC1180	57 % (Q: 83.0 %/S: 81.1 %)	oxidoreductase { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC1178	58 % (Q: 98.3 %/S: 95.8 %)	oxidoreductase { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }

XAC1160	83 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	oxidoreductase { <i>Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi</i> }
XAC2893	70 % (Q: 99.7 %/S:100.0 %)	oxidoreductase (<i>yagR</i>) { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC2894	74 % (Q:100.0 %/S: 99.4 %)	oxidoreductase (<i>yagS</i>) { <i>Escherichia coli K12</i> }
XAC2895	62 % (Q: 99.5 %/S:102.8 %)	oxidoreductase (<i>yagT</i>) { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC2051	33 % (Q: 99.8 %/S: 99.8 %)	oxidoreductase { <i>Mesorhizobium loti</i> }
XAC3960	38 % (Q: 99.7 %/S: 97.5 %)	oxidoreductase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC2136	39 % (Q: 96.9 %/S: 61.5 %)	oxidoreductase { <i>Streptomyces coelicolor</i> }
XAC0384	52 % (Q:100.0 %/S:100.4 %)	oxidoreductase { <i>Mesorhizobium loti</i> }
XAC0288	61 % (Q: 97.5 %/S: 99.7 %)	oxidoreductase (<i>mocA</i>) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0583	37 % (Q: 99.2 %/S:103.4 %)	oxidoreductase { <i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i> }
XAC3738	56 % (Q: 76.9 %/S: 97.9 %)	oxidoreductase { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC1667	38 % (Q:100.5 %/S: 99.8 %)	oxidoreductase { <i>Corynebacterium glutamicum</i> }
XAC3590	49 % (Q: 90.1 %/S: 88.9 %)	oxidoreductase { <i>Mesorhizobium loti</i> }
XAC0539	44 % (Q: 95.3 %/S: 97.4 %)	oxidoreductase { <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> }
XAC0580	55 % (Q: 98.8 %/S: 98.4 %)	oxidoreductase { <i>Streptomyces coelicolor</i> }
XAC2835	70 % (Q: 99.4 %/S: 99.1 %)	oxidoreductase (<i>mocA</i>) { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC3199	66 % (Q:100.0 %/S: 99.4 %)	oxidoreductase { <i>Streptomyces coelicolor</i> }
XAC4199	34 % (Q: 90.4 %/S: 86.5 %)	polyvinylalcohol dehydrogenase { <i>Xylella fastidiosa 9a5c</i> }
XAC0287	58 % (Q: 98.8 %/S: 89.9 %)	quinone oxidoreductase { <i>Escherichia coli O157:H7 EDL933</i> }
XAC0794	68 % (Q: 97.8 %/S: 99.4 %)	quinone reductase { <i>Caulobacter crescentus</i> }
XAC2750	47 % (Q: 99.1 %/S:100.4 %)	reductase { <i>Streptococcus thermophilus</i> }
XAC3477	81 % (Q: 97.5 %/S: 97.5 %)	rhizopine catabolism protein <i>mocA</i> (<i>mocA</i>) { <i>Agrobacterium tumefaciens</i> }
XAC1960	36 % (Q: 97.9 %/S: 98.7 %)	ring hydroxylating dioxygenase, alpha-subunit { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC3414	67 % (Q: 96.1 %/S: 90.7 %)	rubredoxin (<i>rubA</i>) { <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> }
XAC3431	57 % (Q:100.4 %/S: 95.4 %)	short chain dehydrogenase { <i>Caulobacter crescentus</i> }
XAC2675	45 % (Q: 80.3 %/S: 74.5 %)	short chain dehydrogenase { <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> }
XAC1484	42 % (Q: 99.6 %/S:103.9 %)	short chain dehydrogenase { <i>Leishmania major</i> }
XAC3591	33 % (Q:100.0 %/S: 94.5 %)	short chain dehydrogenase { <i>Streptomyces coelicolor A3(2)</i> }
XAC2233	66 % (Q: 94.0 %/S: 92.7 %)	short chain dehydrogenase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC1962	48 % (Q: 93.9 %/S: 97.7 %)	short chain dehydrogenase { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
XAC0083	70 % (Q: 99.2 %/S: 99.6 %)	short chain dehydrogenase { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }
XAC0082	71 % (Q:100.0 %/S: 99.7 %)	short chain oxidoreductase { <i>Sinorhizobium meliloti</i> }

Anexo 10 - Complexo ATP sintase

Em verde apresentam-se os genes encontrados em *Xanthomonas citri* com base no banco de dados do Kegg (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000), após publicação do genoma seqüenciado. Detalhes destes genes seguem abaixo:

ATP sintase

XAC3655	84 % (Q:100.0 %/S:100.4 %)	ATP synthase, A chain (atpB or uncB or papD) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3651	90 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	ATP synthase, alpha chain (atpA or uncA) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3653	78 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	ATP synthase, B chain (atpF or uncF) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3649	89 % (Q: 99.6 %/S:100.0 %)	ATP synthase, beta chain (atpD) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3654	82 % (Q: 98.0 %/S: 97.0 %)	ATP synthase, C chain (atpE or uncE) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3652	63 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	ATP synthase, delta chain (atpH or uncH) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3648	84 % (Q:100.0 %/S: 97.9 %)	ATP synthase, epsilon chain (atpC) { <i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c}
XAC3650	86 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	ATP synthase, gamma chain (atpG or uncG or papC) { <i>Xylella fastidiosa</i> }

Anexo 11 - Complexo Piruvato Desidrogenase

Em verde apresentam-se os genes encontrados em *Xanthomonas citri* com base no banco de dados do Kegg (Kanehisa, M. and Goto, S, 2000), após publicação do genoma sequenciado. Detalhes destes genes seguem abaixo

Complexo Piruvato desidrogenase

1003.1	92 % (Q:100.0 %/S:101.2 %)	dihidrolipoamide acetyltransferase (phdB) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
574.1	93 % (Q:100.0 %/S:100.6 %)	dihidrolipoamide acyltransferase (pdhB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
1005.1	95 % (Q:101.3 %/S:100.0 %)	dihidrolipoamide dehydrogenase (lpdA or lpd) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
4369.1	97 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	pyruvate dehydrogenase (aceE) { <i>Xylella fastidiosa</i> }
7580.1	93 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	pyruvate dehydrogenase (poxB) { <i>Escherichia coli</i> O157:H7 EDL933}
568.1	92 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	pyruvate dehydrogenase E1alpha subunit (pdhA) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }
571.1	98 % (Q:100.0 %/S:100.0 %)	pyruvate dehydrogenase E1beta subunit (pdhB) { <i>Pseudomonas aeruginosa</i> }

Anexo 12 – Microscopia Eletrônica de *Xanthomonas* no mesófilo foliar

Fotos de E. W. Kitajima (ESALQ/USP/Brazil).

Anexo 13 - Categorias oficiais de genes do genoma de *Xanthomonas citri*

I. Intermediary metabolism

A. Degradation

1. Degradation of polysaccharides and oligosaccharides
2. Degradation of small molecules
3. Degradation of lipids

B. Central intermediary metabolism

1. Amino sugars
2. Entner-Doudoroff
3. Gluconeogenesis
4. Glyoxylate bypass
5. Miscellaneous glucose metabolism
6. Non-oxidative branch, pentose pathway
7. Nucleotide hydrolysis
8. Nucleotide interconversions
9. Phosphorus compounds
10. Pool, multipurpose conversions
11. Sugar-nucleotide biosynthesis, conversions
12. Sulfur metabolism

C. Energy metabolism, carbon

1. Aerobic respiration
2. Anaerobic respiration and fermentation
3. Electron transport
4. Glycolysis
5. Oxidative branch, pentose pathway
6. Pyruvate dehydrogenase
7. TCA cycle
8. ATP-proton motive force interconversion

D. Regulatory functions

1. Two component systems
2. Activators-Repressors
3. Kinases-Phosphatases
4. Sigma factors and other regulatory components
5. Not used

II. Biosynthesis of small molecules

A. Amino acids biosynthesis

1. Glutamate family/nitrogen assimilation
2. Aspartate family, pyruvate family
3. Glycine-serine family/sulfur metabolism
4. Aromatic amino acid family
5. Histidine

B. Nucleotides biosynthesis

1. Purine ribonucleotides
2. Pyrimidine ribonucleotides
3. 2'-Deoxyribonucleotides
4. Salvage of nucleosides and nucleotides

C. Sugars and sugar nucleotides biosynthesis

D. Cofactors, prosthetic groups, carriers biosynthesis

1. Biotin
2. Folic acid
3. Lipoate
4. Molybdopterin
5. Pantothenate
6. Pyridoxine
7. Pyridine nucleotides
8. Thiamin
9. Riboflavin
10. Thioredoxin, glutaredoxin, glutathione
11. Menaquinone, ubiquinone
12. Heme, porphyrin
13. Biotin carboxyl carrier protein (BCCP)
14. Cobalamin
15. Enterochelin

- 16. Biopterin
 - 17. Others
- E. Fatty acid and phosphatidic acid biosynthesis
- F. Polyamines biosynthesis
- III. Macromolecule metabolism
 - A. DNA metabolism
 - 1. Replication
 - 2. Structural DNA binding proteins
 - 3. Recombination
 - 4. Repair
 - 5. Restriction, modification
 - B. RNA metabolism
 - 1. Ribosomal and stable RNAs
 - 2. Ribosomal proteins
 - 3. Ribosomes - maturation and modification
 - 4. Aminoacyl tRNA synthetases, tRNA modification
 - 5. RNA synthesis, modification, DNA transcription
 - 6. RNA degradation
 - C. Protein metabolism
 - 1. Translation and modification
 - 2. Chaperones
 - 3. Protein degradation
 - D. Other macromolecules metabolism
 - 1. Polysaccharides
 - 2. Phospholipids
 - 3. Lipoprotein
- IV. Cell structure
 - A. Membrane components
 - 1. Inner membrane
 - 2. Outer membrane constituents
 - B. Murein sacculus, peptidoglycan
 - C. Surface polysaccharides, lipopolysaccharides, and antigens
 - D. Surface structures
- V. Cellular processes
 - A. Transport
 - 1. Amino acids, amines
 - 2. Anions
 - 3. Carbohydrates, organic acids, alcohols
 - 4. Cations
 - 5. Nucleosides, purines, pyrimidines
 - 6. Protein, peptide secretion
 - 7. Other
 - B. Cell division
 - C. Chemotaxis and mobility
 - D. Osmotic adaptation
 - E. Cell killing
- VI. Mobile genetic elements
 - A. Phage-related functions and prophages
 - B. Plasmid-related functions
 - C. Transposon- and intron-related functions
- VII. Pathogenicity, virulence, and adaptation
 - A. Avirulence
 - B. Hypersensitive response and pathogenicity
 - C. Toxin production and detoxification
 - D. Host cell wall degradation
 - E. Exopolysaccharides
 - F. Surface proteins
 - G. Adaptation, atypical conditions
 - H. Other
- VIII. Hypothetical
 - A. Conserved hypothetical proteins
 - B. Hypothetical proteins (includes no hits or only low score hits)
 - C. *Xanthomonas* conserved hypothetical
- IX. CDSs with undefined category

Anexo 14 – Resumo Geral

Características	<i>Xanthomonas citri</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>
Doença	Cancro Cítrico	CVC
Ambiente de vida	Espaço Intersticial	Xilema
Tamanho (bp)	5,175,422	2,679,305
Razão C+G	64.70%	52.67%
CDS's	4,266	2,838
Operons de RNA Ribosomal	2	2
tRNAs	54	46
Plasmídeos	pXac65	pXF51
Tamanho (bp)	65,124	51,158
Razão G+C	61.40%	49.57%
CDS's	112	64.00%
Tamanho (bp)	pXac33 33,699	pXF1.3 1,285
Razão G+C	61.90%	55.56%
CDS's	55	2
Categorias	<i>Xanthomonas citri</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>
Metabolismo Intermediário	720	226
Biossíntese de Pequenas Moléculas	353	216
Metabolismo de Macromoléculas	497	356
Estrutura Celular	223	128
Processos Celulares	359	118
Elementos Genéticos Móveis	146	135
Pathogenicidade, virulência e adaptação	293	128
Hipotéticas	1636	1517
CDS's com categorias indefinidas	105	24
Metabolismo	<i>Xanthomonas citri</i>	<i>Xylella fastidiosa</i>
Glicólise	Completa	Completa
Gliconeogênese	Completa	Incompleta
Ciclo de Krebs (TCA)	Completa	Completa
Via das Pentoses	Completa	Incompleta
Via do Glioxilato	Completa	Ausente
Ciclo da Uréia	Completa	Incompleta
Biossíntese de Ácidos Graxos	Completa	Completa
Metabolismo de Aminoácidos	Completa	Completa
Beta-oxidação	Completa	Ausente
Degradação de Poli e Oligossacarídeos	44	0
Degradação de Pequenas Moléculas	93	33
Funções Regulatórias	296	77

OBSERVAÇÃO

NÃO FOI AUTORIZADA A INCLUSÃO DO(S)
ARTIGO(S) NESTE ARQUIVO