UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Gustavo Antônio Teixeira Chaves

Captação de ferro e efeito desse metal para crescimento e morfologia de
Xylella fastidiosa

Versão revisada

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

12/11/2012

Gustavo Antônio Teixeira Chaves

**Captção de ferro e efeito desse metal para crescimento e morfologia de
*Xylella fastidiosa***

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre em Ciências, área Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva

São Paulo
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E A DIVULGAÇÃO DE TODO OU PARTE DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO DO CONJUNTO DAS QUÍMICAS

Chaves, Gustavo Antonio Teixeira

Captação de ferro e efeito desse metal para crescimento e morfologia de *Xylella fastidiosa*. / Gustavo Antônio Teixeira Chaves. --São Paulo, 2012.

Orientadora: Aline Maria da Silva.

84 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica.

Descritores: 1. Homeostase de ferro 2. Bacteria 3. Sideróforos 4. Curva de crescimento 5. Biofilme 6. EPS 7. *Xylella fastidiosa*. I. da Silva, Aline Maria II. Universidade de São Paulo. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). III. Título.

Gustavo Antônio Teixeira Chaves

Captação de ferro e efeito do metal para crescimento e morfologia de *Xylella fastidiosa*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área Bioquímica.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Dedico esse trabalho à minha família, minha fortaleza e inspiração.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, pai, mãe, irmã, vó e todo mundo mais, pelo suporte e pelo amor, por tudo, sem vocês esse trabalho não teria se concretizado. Quero agradecer muito à minha orientadora Profa. Dra. Aline Maria da Silva por tudo, os ensinamentos, o ambiente de trabalho, tudo tudo tudo. Também quero agradecer ao Dr. Paulo Adriano Zaini, pelas conversas, dicas e compreensão, pela ajuda e disponibilidade sempre. Outra pessoa muito importante a quem eu quero agradecer é a minha amiga Dra. Marilene Silva Oliveira, pela amizade e presença incondicionais, pelos conselhos e ajuda com experimentos, e tudo mais, muito muito muito muito obrigado. Agradeço também ao técnico do nosso laboratório, Alexandre Sanchez, pela eficiência e prestatividade e aos grupos de pesquisa liderados pelos professores Dr. Walter Terra, Dra. Regina Lúcia Baldini, Dra. Suely Lopes Gomes e Dra. Glaucia Mendes Souza, pelos equipamentos e reagentes disponibilizados.

Quero agradecer muito aos meus amigos, que foram força e companhia quando eu precisei, e quando eu não precisei também. Muito obrigado ao pessoal da HGF, André, Marcelo e Vitor, por serem presentes, amigos, família. Quero agradecer também a outras pessoas muito importantes e que também estiveram comigo ao longo dessa jornada, Lucas, por ter vivido isso comigo, Tati, pessoas que me ajudaram/ajudam a acreditar, mesmo nos momentos mais difíceis. Também quero agradecer aos amigos do IQ, aos amigos do lab, Rodrigo, Paulo, Ana, Luciana, Oséias, Wesley, Joaquim, Deibs, Fernando, Alê, pela ajuda e por produzirem um ambiente de trabalho agradável e estimulante. Finalmente, quero agradecer a um grupo de pessoas que foram muito importantes anteriormente ao mestrado, mas cuja importância ainda se faz presente. Muito obrigado ao Prof. Dr. Fernando Fortes Valência, por ter salvado minha graduação; à Júlia, por ter me dado qualquer apoio que eu precisasse, bem no comecinho de tudo; ao pessoal de uma república muito louca onde eu morei; à Liviazinha, que me abriu os olhos há muito tempo atrás; à Ju, que me ensinou a pipetar; à Isa, que me deu uma visão mais realista de trabalho; as minhas ex-orientadoras de Brasília, que acreditaram em mim; aos meus amigos de Anápolis, aos meus amigos de Brasília...

Agradeço também ao CNPq e à FAPESP, agências financiadoras desse projeto, pela concessão da bolsa de Mestrado.

“Seria possível, eu me pergunto, estudar um pássaro tão intimamente, observar e catalogar suas peculiaridades nos mais diminutos detalhes, a ponto de ele se tornar invisível? Seria possível, enquanto calculando meticulosamente a envergadura de suas asas ou a extensão de seu tarso, de alguma forma perdemos de vista sua poesia? Que em nossas prosaicas descrições de uma plumagem marmórea ou vermiculada, deixemos escapar um lampejo de telas vivas, cascatas de marrons cuidadosamente dosados e dourados que envergonhariam Kandinsky, explosões enevoadas de cor que se rivalizariam com Monet? Eu acredito que sim. Acredito que, aos nos aproximarmos de nosso objeto de estudo com a sensibilidade de estatísticos e disseccionistas, nós nos distanciamos cada vez mais do maravilhoso e fascinante planeta da imaginação cuja gravidade nos atraiu, antes de tudo, aos nossos estudos” Daniel Dreiberng, em Watch Men, de Alan Moore

RESUMO

Chaves, Gustavo Antônio Teixeira. **Captação de ferro e efeito do metal para crescimento e morfologia de *Xylella fastidiosa***. 2012. 84p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação Ciências, área Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O ferro é essencial para a sobrevivência das bactérias, estando envolvido em vários processos metabólicos. Apesar de sua baixa solubilidade, as bactérias dispõem de sistemas eficientes e específicos para captação, utilização e armazenamento desse metal, ao mesmo tempo controlando adequadamente a concentração de ferro livre no meio, para evitar seus potenciais efeitos tóxicos. *Xylella fastidiosa* é uma bactéria gram-negativa que coloniza o xilema de uma diversidade de plantas cultivadas e silvestres em várias partes do mundo, sendo o agente causador de uma série de doenças em plantas economicamente importantes como citros, videiras e café. Alguns mecanismos de virulência de *X. fastidiosa* já foram elencados, entre esses a formação de biofilme, que promoveria a oclusão do xilema e consequente estresse hídrico para a planta. Postula-se que a captação de ferro por *X. fastidiosa*, causando redução da concentração desse metal no xilema das plantas infectadas, seja uma das estratégias utilizadas pela bactéria em seu processo de infecção. Nosso objetivo neste trabalho foi de investigar o processo de captação de ferro por *X. fastidiosa* e avaliar em maior detalhe o efeito da concentração de ferro no crescimento e na expressão de fatores de virulência dessa bactéria, expandindo os estudos anteriormente realizados em nosso grupo. Para tal propusemos: (i) avaliar a capacidade de *X. fastidiosa* produzir sideróforos, pequenas moléculas quelantes de ferro; (ii) investigar, em condições de cultivo com diferentes concentrações de ferro, o perfil de expressão de alguns genes de *X. fastidiosa* que possam ser integrantes do stimulon do ferro; (iii) analisar o efeito da concentração de ferro no crescimento e formação de biofilme por *X. fastidiosa*. Observamos que *X. fastidiosa* parece produzir um composto quelante de ferro que pode ser um sideróforo e elencamos alguns genes que poderiam estar envolvidos na síntese desse composto. Confirmamos que ferro é necessário para o crescimento de *X. fastidiosa*, sendo que em alta concentração de ferro foi observada maior deposição de biofilme pela cultura bacteriana. Interessantemente também foi observado que as células crescidas em meio com pouco ferro secretaram mais exopolissacarídeos totais na fração do biofilme, o que estabelece uma relação entre as concentrações de ferro no meio com a expressão de um fator de virulência essencial para o desenvolvimento da infecção por *X. fastidiosa*.

Palavras chave: Homeostase de ferro; *Xylella fastidiosa*; Sideróforos; Curva de crescimento; Biofilme; EPS

ABSTRACT

Chaves, Gustavo Antônio Teixeira. **Iron uptake and effect to growth and morphology of *X. fastidiosa***. 2012. 84p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Iron is an essential nutrient for bacteria, being involved in many metabolic processes. Despite its low solubility, bacteria present efficient and specific systems for uptake, utilization and storage of iron, meanwhile controlling metal concentration adequately to prevent potential toxic effects of free iron. *Xylella fastidiosa* is a Gram-negative bacterium which colonizes the xylem of a wide range of crops and wild species of plants worldwide. This bacterium is the agent of several diseases affecting economically important crops, such as citrus, grapevine and coffee. Among the proposed *X. fastidiosa* virulence mechanisms is the formation of biofilm which may occlude xylem vessels causing hydric stress. It is postulated that iron uptake might cause reduction of its concentration within the xylem of infected plants, therefore constituting a virulence strategy during bacterial infection process. Our aims in this work were to investigate the process of iron uptake in *X. fastidiosa* and to evaluate the effect of iron concentration in the growth and morphology of this bacterium, expanding previous studies. For this we set to: (i) investigate the capacity of *X. fastidiosa* in producing siderophores, small biomolecules utilized for iron quelation; (ii) evaluate, under culture conditions at different iron concentrations, the expression profile of candidate genes that might be part of the iron stimulon; (iii) analyse the effect of iron concentration in growth and biofilm formation of *X. fastidiosa*. We observed that *X. fastidiosa* seems to produce a compound with iron quelating ability, such as a siderophore, and we point to a group of genes that might be involved in the synthesis of this compound. We confirmed that iron is necessary for growth of *X. fastidiosa*. At high concentrations of iron we observed a higher biofilm production. Interestingly, we also observed that when grown in low iron concentration, *X. fastidiosa* secretes more exopolysaccharides (EPS) associated with the biofilm, suggesting a link between iron concentration and expression of an essential virulence factor to the infection process of *X. fastidiosa*.

Key words: Iron homeostasis; *Xylella fastidiosa*; Siderophores; Growth curve; Biofilm; EPS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC: *ATP binding cassette*

ALS: Escaldadura foliar de amendoeiras

CAS: Chrome Azurol Sulfonate

cDNA: DNA complementar

CDS: sequência codificadora

CT: meio Controle

CVC: Clorose variegada dos citrus

DNA: ácido deoxiribonucleico

DFO: Desferrioxamina E

DO_{600nm}: Densidade ótica a 600 nm

DP: 2,2'-dipiridil

DSF: Fator sinalizador difusível

DTT: Ditionitrieto

ESST3: Efetores do sistema de secreção do tipo III

EPS: Exopolissacarídeos

ERO: Espécie reativa de oxigênio

Fe: element Fe

Fur: Ferric uptake regulator

HI: meio *High iron*

ICP-AES: espectrometria de emissão ótica com acoplamento de plasma induzido

LI: meio *Low iron*

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

mRNA: RNA mensageiro

NI: meio *No iron*

NRPS: Peptídeo sintase não-ribossomal (do inglês Non-Ribossomal Peptide Synthase)

PD: doença de Pierce

pH: potencial hidrogeniônico

PIM-6: meio de cultura mínimo

PLS: Escaldadura foliar de ameixeiras

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonila

PP: Pirofosfato férrico

PWG: meio complexo PW contendo glicose 0,5%

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RT-qPCR: Transcrição reversa seguida de qPCR

sRNA: pequeno RNA não-codificante

SST1: Sistema de secreção do tipo I

SST2: Sistema de secreção do tipo II

SST3: Sistema de secreção do tipo III

SST4: Sistema de secreção do tipo IV

T4P: Pilus do tipo 4

TBDR: Receptor dependente de TonB

VLI: meio *Very low iron*

UFC: Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
1.1. Homeostase de ferro em bactérias	12
1.1.2. Mecanismos de captação e armazenamento de ferro em bactérias	13
1.1.3. Regulação da expressão gênica dependente de ferro em bactérias.....	17
1.2. <i>Xylella fastidiosa</i> , uma bactéria fitopatogênica.....	19
1.2.1. Mecanismos de patogenicidade e virulência de <i>X. fastidiosa</i>	21
1.3. Importância dos sistemas de homeostase de ferro para virulência de bactérias	25
2. Objetivos	28
3. Procedimentos experimentais	29
3.1. Manutenção e cultivo de <i>X. fastidiosa</i>	29
3.2. Quantificação da captura de citrato férrico.....	29
3.3. Detecção da produção de sideróforos	29
3.4. Curva de crescimento de <i>X. fastidiosa</i> em diferentes concentrações de ferro	30
3.4.1. Multiplicação celular	31
3.4.2. Formação de biofilme	31
3.5. Crescimento e formação de biofilme em meio mínimo com diferentes concentrações de ferro.....	31
3.6. Dosagem de exopolissacarídeos totais associados ao biofilme	32
3.7. Análise da morfologia do biofilme	32
3.7.1. Observação em lupa estereoscópica.....	32
3.7.2. Visualização por microscopia eletrônica de varredura	33
3.8. Avaliação da Agregação Celular.....	33
3.9. Análise de expressão gênica por RT-qPCR.....	34
3.9.1. Isolamento de RNA total.....	34
3.9.2. Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa (RT-qPCR).....	34
3.11. Análises comparativas de sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos.....	36
4. Resultados e Discussão	37
4.1. Análise comparativa de genes associados ao metabolismo de ferro em cepas de <i>X. fastidiosa</i>	37
4.2. Avaliação da captação de ferro em <i>X. fastidiosa</i>	40
4.3. Busca por genes potencialmente associados à síntese de sideróforo em <i>X. fastidiosa</i>	44
4.4. Crescimento e formação de biofilme de <i>Xylella fastidiosa</i> crescida em carência e excesso de ferro	48
5. Considerações finais	61

6. Referências bibliográficas.....	65
Súmula Curricular	i

1. Introdução

1.1. Homeostase de ferro em bactérias

O ferro é o quarto metal mais abundante na superfície terrestre, podendo existir em dois estados de oxidação diferentes. A forma férrica (Fe^{3+}), altamente insolúvel, é encontrada na presença de altas concentrações de oxigênio, enquanto que a forma ferrosa (Fe^{2+}), é bem mais solúvel, mas só é encontrada em ambientes em anóxia ou com baixo pH. Devido ao potencial de oxido-redução do ferro estar próximo do necessário em reações biológicas, variando de -300 mV a +700 mV, dependendo dos ligantes e do ambiente proteico em que se encontra, observa-se a utilização desse metal pela grande maioria dos seres vivos em funções celulares diversas (Andrews *et al.*, 2003a; Andrews, 2010; Chu *et al.*, 2010).

O ferro normalmente é utilizado como grupo prostético ou cofator de proteínas envolvidas em funções como síntese de aminoácidos, fixação de nitrogênio, ciclo do ácido cítrico, síntese de aminoácidos, resistência a estresse redox e transporte de oxigênio. O ferro também é utilizado por proteínas transportadoras de elétrons envolvidas em processos de respiração celular e captação de luz (Andrews *et al.*, 2003a; Chu *et al.*, 2010; Braun e Hantke, 2011). O ferro é de extrema importância para as bactérias, sendo que apenas algumas bactérias do gênero dos *Lactobacillus*, juntamente com *Borrelia burgdorferi*, já foram apontadas como capazes de se desenvolver e multiplicar em ambiente livre de ferro, utilizando-se de outros metais, como manganês e cobalto, para desempenhar suas funções metabólicas (Andrews *et al.*, 2003a; Smith, 2004).

Apesar da necessidade biológica por ferro, esse metal apresenta um viés negativo para os seres vivos, uma vez que quando livre em solução, ele gera espécies reativas de oxigênio (EROs) através da reação de Fenton (1). Estas espécies químicas são extremamente instáveis e podem reagir com biomoléculas, danificando as mesmas ou até mesmo destruindo-as, comprometendo a homeostase celular. Dessa forma, o ferro está sempre associado a proteínas ou outros ligantes dentro dos organismos, garantindo a solubilidade do metal e ao mesmo tempo prevenindo a formação acidental de radicais tóxicos (Touati, 2000; Andrews *et al.*, 2003a; Smith, 2004; Chu *et al.*, 2010; Braun e Hantke, 2011).

Refletindo a relevância do ferro para seu metabolismo, as bactérias desenvolveram sistemas responsáveis por suprir as necessidades nutricionais por esse metal e por evitar

sua captação em excesso. Diversas vias de utilização e armazenamento de ferro já foram descritas em bactérias, sendo que, em sua maior parte, tais processos são regulados a nível transcricional a partir da disponibilidade de ferro no meio (McHugh *et al.*, 2003; Smith, 2004; Carpenter *et al.*, 2009; Cornelis, 2010; Jones e Wildermuth, 2011)

1.1.2. Mecanismos de captação e armazenamento de ferro em bactérias

Para grande parcela das bactérias, o ferro presente em seu ambiente de crescimento não se encontra prontamente disponível para ser utilizado. Em ambientes aeróbios e de pH neutro ou básico, o ferro, na forma oxidada, está predominantemente insolúvel e precisa ser complexado e solubilizado para captação. Bactérias de vida livre encontram o ferro complexado com íons óxidos do meio, enquanto que bactérias patogênicas devem encontrar o ferro complexado com ácidos orgânicos ou proteínas do hospedeiro. Além disso, o ferro encontrado no hospedeiro tende a estar em concentração reduzida como estratégia para combater a infecção. Para driblar esses obstáculos e conseguir mobilizar o metal, as bactérias se utilizam de mecanismos de captação de ferro extremamente específicos, que garantem sua adaptação diante de condições adversas (Andrews *et al.*, 2003a; Andrews, 2010; Hood e Skaar, 2012).

Certamente uma das formas mais eficientes para captação de ferro extracelular encontrada por bactérias se dá através da síntese de sideróforos, pequenas biomoléculas, com tamanho de 400 a 1000 Da, que apresentam altíssima afinidade por íon férrico. Essas moléculas já foram encontradas sendo sintetizadas por bactérias, plantas e fungos, sendo predominante como forma de captação entre bactérias. Os sideróforos apresentam grupos químicos, geralmente catecolatos, fenolatos e α -hidroxicarboxilatos, que provêm um conjunto de ligantes de alta afinidade para coordenação de íon férrico. Cada ligante se posiciona em uma orientação fixa, sendo que um total de seis pontos de coordenação envolvem o íon férrico em uma estrutura octaédrica, eficiente para captação do metal. A figura 1 apresenta a estrutura química de alguns sideróforos já estudados. (Andrews *et al.*, 2003a; Chu *et al.*, 2010; Smits e Duffy, 2011).

A maioria dos sideróforos são sintetizados por peptídeo sintases não-ribossomais (NRPS), as quais são enzimas multimodulares que se assemelham às ácido graxo sintases de tipo I de eucariotos (Chan e Vogel, 2010). Essa via de síntese foi a primeira a ser elucidada e continua sendo a mais importante entre bactérias, sendo responsável pela síntese de muitos dos sideróforos já conhecidos, como enterobactina, de *Escherichia coli*, vibriobactina, de *Vibrio* spp., pioquelina, de *Pseudomonas* spp., yersiniabactina, de *Yersinia pestis* e crisobactina, de *Erwinia* spp. (Crosa e Walsh, 2002b; Chu *et al.*, 2010).

Crisobactina **Agrobactina** **Yersiniabactina** **Desferrioxamina E** **Acromobactina** **Pioverdina**

Figura 1. Estrutura química de alguns sideróforos produzidos por bactérias fitopatogênicas. Crisobactina, isolado de *Dickeya dadantii* (Persmark *et al.*, 1989); Agrobactina, isolado de *Agrobacterium tumefaciens* (Ong *et al.*, 1979); Yersiniabactina, produzido por *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, inicialmente caracterizado em *Yersinia pestis* (Crosa e Walsh, 2002b; Jones *et al.*, 2007); Desferrioxamina E, produzido por *Erwinia amylovora* (Smits e Duffy, 2011); Acromobactina, produzido por *Dickeya dadantii* e *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a (Franza *et al.*, 2005; Berti e Thomas, 2009); Pioverdina, isolada de *Pseudomonas aeruginosa* produzido por bactérias do gênero *Pseudomonas*, inclusive pelos diferentes patovares de *Pseudomonas syringae* (Meyer, 2000; Cornelis, 2010).

Recentemente foi descoberta uma nova via de síntese de sideróforos, independente de NRPS. Sideróforos como aerobactina, de *E. coli*, rizobactina, de *Rhizobium* spp., e desferrioxamina E, de *Erwinia amylovora*, são baseados em moléculas como ácidos dicarboxílicos ou amino alcoóis, que são ultimamente derivados de aminoácidos. Para todas as bactérias estudadas que apresentaram algum sideróforo sendo sintetizado por essa via, encontrou-se algum gene com alta similaridade a *iucA* ou *iucB*, os quais codificam para as sideróforo sintases responsáveis pela montagem do sideróforo aerobactina em *E. coli* (Barry e Challis, 2009).⁹

Os sideróforos, uma vez sintetizados, são exportados para o espaço extracelular, onde complexam átomos de ferro disponíveis. Os sideróforos complexados com ferro, ou ferrisideróforos, são internalizados por transporte ativo. As células de bactérias Gram-negativas apresentam em sua superfície transportadores com alta afinidade por sideróforos complexados com ferro. Como esquematizado na figura 2, esses transportadores são constituídos de uma estrutura em barril beta, com 22 fitas beta. O barril beta é ocluído por um domínio de aproximadamente 160 resíduos de aminoácidos enovelado independentemente. O processo de internalização do ferrisideróforo através desse transportador é dependente de energia, a qual é provida a partir da energia próton-motriz da membrana interna. A proteína TonB, que atravessa todo o espaço periplasmático, juntamente com as proteínas ExbB e ExbD, ambas ancoradas à membrana interna (figura 2), são proficientes na transdução da energia próton-motriz associada à membrana interna, permitindo abertura do canal e transporte do complexo férrico para o periplasma. Os receptores dependentes de TonB, como são chamados esses transportadores, são responsáveis pela internalização de todos complexos férricos utilizados por bactérias, transportando desde complexos pequenos, por exemplo ferro ligado a citrato, como complexos grandes, por exemplo ferro ligado a proteína transferrina. Esses receptores, além de sua grande importância na captação de ferro complexado, também são importantes para captação de açúcares, vitamina B12 e até bacteriófagos (Rabsch *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2010; Cornelis, 2010; Noinaj *et al.*, 2010; Krewulak e Vogel, 2011).

O sideróforo, ou qualquer outro complexo férrico transportado para o espaço periplasmático, é então ligado a uma proteína periplasmática ligante de ferro, que irá finalmente transportar o complexo para um transportador ABC cognato localizado na membrana interna. O transportador ABC transfere o complexo férrico para o citoplasma num processo dependente de ATP. No espaço intracelular o sideróforo pode ser degradado ou reciclado posteriormente à retirada do seu átomo de ferro. É importante frisar que, apesar de esse ser o paradigma para o processo de captação de ferro através de sideróforos em

Figura 2. Estrutura tridimensional da proteína FhuA, de *Escherichia coli*, um receptor dependente do sistema de energização TonB-ExbB-ExbD. O sistema de energização está esquematizado na figura juntamente com o receptor. Adaptado de <http://personal.bgsu.edu/~yivanov/Research.html>

bactérias Gram-negativas, existem mecanismos alternativos nesse processo, como por exemplo, a captação de ferro por *Yersinia pestis*, que não apresenta uma proteína periplasmática ligante de ferro, ou por *Pseudomonas aeruginosa*, cujo sideróforo, pioverdina, não entra no citoplasma, mas antes tem seu átomo de ferro reduzido no periplasma. O sideróforo, com baixa afinidade por ferro reduzido, se separa do metal e, nesse caso, já é externalizado para captação de um novo átomo de ferro (Chu *et al.*, 2010; Braun e Hantke, 2011). Em bactérias Gram-positivas, a utilização de sideróforos independe de transportadores dependentes do sistema de energização Tonb-ExbB-ExbD. Nessas bactérias os sideróforos são diretamente transferidos para uma proteína ligante de ferro, a qual transfere o complexo ferro-sideróforo diretamente para o transportador ABC cognato localizado na membrana citoplasmática (Andrews *et al.*, 2003a).

Outra estratégia de obtenção de ferro muito importante para bactérias, principalmente para as que são patógenos de mamíferos, ocorre pela captação de ferro ligado a um anel porfirínico, ou grupo heme. Grupos heme são prontamente internalizados por receptores dependentes de TonB, mas também podem ser internalizados ligados a

proteínas. Existe, entre as bactérias, uma ampla gama de meios de captação de ferro hêmico, seja através de ligação e captação de hemoproteínas, degradação e retirada do grupo heme de proteínas que o contenham, ou simples captação do grupo heme livre disponível. No caso de bactérias que são patógenos de animais, também ocorre captação de ferro ligado a proteínas do hospedeiro, como transferrina e lactoferrina, cujas funções são, respectivamente, transporte e captura de ferro. A internalização desses complexos contendo ferro também é realizada por receptores dependentes de TonB (Andrews, 2010; Chu *et al.*, 2010),

Uma vez disponível para a célula no citoplasma, o ferro é reduzido, podendo se associar a proteínas que exercem funções metabólicas variadas ou que funcionam como reguladores de expressão gênica, ou ainda ser armazenado em uma forma não-reativa (Andrews *et al.*, 2003a).

A capacidade de armazenamento de ferro é extremamente relevante, tanto pela possibilidade de gerar uma reserva de nutriente como pela diminuição dos potenciais efeitos tóxicos que o ferro pode desempenhar quando livre em solução. Esse papel de armazenamento de ferro, em bactérias, é desempenhado por proteínas ferritinas e proteínas semelhantes à ferritina. Essas proteínas oxidam os íons ferrosos em excesso e armazenam os íons férricos resultantes num sítio não-reativo, no interior das proteínas, ocultando o metal de processos celulares. Existem em bactérias três classes descritas de proteínas com capacidade de armazenamento de ferro: ferritina, bacterioferritina e proteínas Dps (Smith, 2004). Apesar de estas proteínas estarem distantemente relacionadas, elas mantêm características comuns que permitem o armazenamento eficiente de átomos de ferro (Andrews *et al.*, 2003a; Smith, 2004)

1.1.3. Regulação da expressão gênica dependente de ferro em bactérias

A homeostase de ferro é finamente regulada de acordo com a disponibilidade de ferro no meio. Para muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o balanço crucial entre capturar quantidade de ferro suficiente para crescer e sobreviver e evitar os efeitos tóxicos do excesso deste metal é controlado pela proteína Fur (*Ferric uptake regulator*) (Crosa, 1997; Hantke, 2001b). Fur atua como um homodímero de subunidades de ~17kDa que, quando ligadas a íon ferroso, associam-se a sequências regulatórias (*Fur box*) em promotores de genes regulados por ferro, reprimindo sua transcrição. Desta forma, em condições onde há diminuição da concentração de Fe^{2+} , os genes controlados por Fur são “desreprimidos” (Escolar *et al.*, 1999; Hantke, 2001b). Fur atua como regulador global, controlando não apenas a expressão de genes relacionados à captação e armazenamento

de ferro, mas também a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, ao metabolismo energético, ao choque ácido e a virulência (Litwin e Calderwood, 1993; Ratledge e Dover, 2000; Touati, 2000; Hantke, 2001a; Hantke, 2001b; Baichoo *et al.*, 2002; Bijlsma *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2003a; Grifantini *et al.*, 2003; Merrell *et al.*, 2003; Ernst *et al.*, 2005; Subramoni e Sonti, 2005; Michel *et al.*, 2006; Belzer *et al.*, 2007; Boulette e Payne, 2007; Kitphati *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007; Zaini *et al.*, 2008a; da Silva Neto *et al.*, 2009; Benjamin *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2010).

Paradoxalmente ao paradigma de Fur atuar como repressor transcricional, a expressão de alguns genes é positivamente regulada por Fur, sendo que na maioria desses casos a transcrição não sofre modulação direta por elementos do tipo Fur *box* e o mecanismo de regulação envolve controle pós-transcricional (Dubrac e Touati, 2000; Hantke, 2001b; Dubrac e Touati, 2002). Regiões promotoras de vários genes regulados de modo dependente de Fur, entre eles o que codifica uma das superóxido dismutase de *E. coli*, aparentemente não possuem uma sequência Fur *box*, sugerindo uma atuação indireta de Fur ou uma regulação pós-transcricional (Dubrac e Touati, 2000; Delany *et al.*, 2001; Dubrac e Touati, 2002; Andrews *et al.*, 2003a).

A descoberta de pequenos RNA não-codificadores (sRNA) apresentou novos mecanismos de controle pós-transcricional que remodelam o metabolismo bacteriano em resposta a diversos sinais ambientais (Waters e Storz, 2009). Em *E. coli*, o sRNA RyhB é apontado atualmente como o principal regulador pós-transcricional da homeostase de ferro (Salvail e Masse, 2012). A expressão de RyhB, em carência de ferro, afeta a tradução de aproximadamente 20 mRNAs que codificam proteínas não-essenciais que utilizam ferro, assegurando que o metal captado possa ser utilizado por proteínas essenciais, como algumas redutases responsáveis pela síntese de biomoléculas essenciais, como DNA ou aminoácidos (Masse e Gottesman, 2002; Jacques *et al.*, 2006; Masse *et al.*, 2007; Salvail e Masse, 2012). Assim como para outros sRNA, a ação de sRNA análogos de RyhB também é modulada pela interação com a proteína Hfq (Metrucchio *et al.*, 2009). Hfq atua como uma chaperonina de RNA, promovendo seu dobramento/desdobramento e sua interação com o mRNA alvo (Valentin-Hansen *et al.*, 2004; Arluison *et al.*, 2007; Zambrano *et al.*, 2009)..

Ainda que o papel de Fur seja predominante na modulação da expressão de genes controlados por ferro, são crescentes as evidências da existência de novos reguladores transcricionais, assim como de genes que podem ser regulados por ferro de modo independente de Fur compreendendo genes que não possuem Fur *box* em suas regiões promotoras (Grifantini *et al.*, 2003; Salvail e Masse, 2012). Ademais, em *B. subtilis*, alguns genes que contem Fur *box* em seus promotores não mostraram regulação evidente por Fur, enquanto outros genes que exibem sequências com pouca ou nenhuma similaridade com a sequência Fur *box* convencional são regulados por Fur (Baichoo *et al.*, 2002). Em trabalho

anteriormente realizado em nosso grupo de pesquisa observou-se que embora a disponibilidade de ferro influencie a abundância de muitos transcritos em *X. fastidiosa*, apenas uma fração destes é diretamente regulada por Fur, o que é indicativo do envolvimento de outros reguladores transcricionais ou de mecanismos de regulação alternativos também nesta bactéria (Zaini, 2007b; Zaini *et al.*, 2008a).

1.2. *Xylella fastidiosa*, uma bactéria fitopatogênica

Xylella fastidiosa é uma bactéria fitopatogênica, Gram-negativa, não-flagelada, cujas principais características são confinamento ao lúmen dos vasos xilemáticos de seus hospedeiros vegetais e necessidade de um inseto vetor para dispersão entre plantas. No hospedeiro vegetal, *X. fastidiosa* forma um biofilme compacto, que eventualmente ocasiona oclusão dos vasos do xilema (Hopkins, 1989; Hopkins e Purcell, 2002; Chatterjee *et al.*, 2008; Janse e Obradovic, 2010). O gênero *Xylella* é composto por uma única espécie, *Xylella fastidiosa*, que faz parte da família das *Xanthomonadaceae*, a qual inclui também os gêneros *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas*. A família *Xanthomonadaceae* pertence à subdivisão gama das proteobactérias, que é modelo em diversificação bacteriana, incluindo espécies comensais e de vida-livre, simbioses intracelulares e patógenos de plantas e animais (Wells *et al.*, 1987; Woese, 1987; Hopkins, 1989; Lerat *et al.*, 2005). Diversas espécies dos gêneros *Xanthomonas* e *Xylella* são fitopatogênicas, ao contrário de algumas espécies de *Stenotrophomonas*, como *S. maltophilia*, que estabelecem interações benéficas com plantas (Chatterjee *et al.*, 2008a; Kay e Bonas, 2009; Ryan *et al.*, 2009). Por outro lado, *S. maltophilia* é um patógeno humano oportunista, com importância crescente em infecções hospitalares (Ryan *et al.*, 2009).

X. fastidiosa foi primeiramente descrita em 1987 como sendo o agente causador de uma doença em videiras (*Vitis nívifera*) e de uma outra em pessegueiros (*Prunus persica*) (Chatterjee *et al.*, 2008b; Janse e Obradovic, 2010). Em algumas espécies de plantas, *X. fastidiosa* aparece como um organismo endofítico aparentemente inofensivo, enquanto que nos hospedeiros suscetíveis, sua proliferação no xilema resulta em sintomas que incluem clorose, lesões necróticas nas folhas, nanismo, deterioração dos galhos, frutos não-adequados, e, eventualmente, morte da planta. Entre as doenças associadas à infecção por *X. fastidiosa*, estão a doença de Pierce (PD) das videiras, causada pela cepa Temecula, a escaldadura foliar de amendoeiras (*almond leaf scorch*, ALS), causada pela cepa a escaldadura foliar do cafeeiro ou requeima do café (*coffee leaf scorch*, CLS), a escaldadura foliar de ameixeiras (*plum leaf scald*, PLS) e a clorose variegada dos citros (CVC), popularmente conhecida como amarelinho (Purcell e Saunders, 1999; Purcell *et al.*, 1999; Hopkins e Purcell, 2002). Apesar de ser patogênica para uma variedade de espécies de

plantas, *X. fastidiosa* é um fitopatógeno especialista, já que a grande maioria das linhagens já descritas são específicas para um hospedeiro vegetal (Janse e Obradovic, 2010). A partir de análises filogenéticas foi possível agrupar diversas linhagens de *X. fastidiosa*, específicas para determinados hospedeiros vegetais, em diferentes subespécies (Schaad et al., 2004; Schuenzel et al., 2005; Hernandez-Martinez et al., 2007; Randall et al., 2009; Janse e Obradovic, 2010): *fastidiosa* ou *piercei*, linhagens de videiras, alfalfa, amendoeira, e bordo; *multiplex*, para linhagens de pêssago, olmo, ameixeira, sicômoro e amendoeira; *pauca*, para linhagens de citros, provavelmente de café e outras linhagens da América do Sul; *sandyi*, para linhagens de espiroleira, jacarandá, magnólia e daylily; *tashke*, para linhagens de chitalpa. Além destas cinco subespécies, uma sexta foi proposta para linhagens de amoreira (*Morus* spp.) e bambú (*Nandina domestica*) (Hernandez-Martinez et al., 2007).

A CVC foi identificada pela primeira vez, em 1987, em laranjais do Estado de São Paulo (Rossetti et al., 1990; Chang et al., 1993), e desde então já foi detectada em pomares citrícolas de outras regiões do Brasil (<http://www.embrapa.gov.br>). Segundo levantamento realizado em 2011 pelo Fundo de Defesa da Citricultura, a CVC atinge 40,3% das plantas do parque citrícola do Estado de São Paulo, sendo que nos últimos anos observou-se um aumento na incidência da doença, possivelmente porque os citricultores deixaram de adotar medidas de prevenção e eliminação de plantas doentes (<http://www.fundecitrus.com.br>).

Os sintomas da CVC incluem clorose intervenal, redução do tamanho das folhas, lesões com presença de goma na face abaxial das folhas, as quais podem eventualmente sofrer necrose. Com o avanço da CVC pode ser observada a desfolha dos ramos mais altos da planta, enrijecimento das cascas dos frutos, os quais apresentam tamanho reduzido e assimetria. As características dos frutos de plantas doentes não somente reduzem seu valor comercial *in natura*, como também prejudica a indústria de sucos (Neves et al., 2001; de Souza et al., 2005). Os sintomas produzidos por *X. fastidiosa* que caracterizam a CVC parecem ser produzidos por estresse hídrico causado por agregados celulares e produção de exopolissacarídeos, que levariam a oclusão dos vasos do xilema (Chatterjee et al., 2008b; Vojnov et al., 2010). Os insetos vetores que propagam *X. fastidiosa* entre os hospedeiros vegetais pertencem às famílias Cicadellidae ou Cercopidae, genericamente chamados de cigarrinhas. Esses insetos são xilófagos, ou seja, se alimentam exclusivamente da seiva xilemática de plantas diversas. Ao se alimentarem de uma planta infectada com *X. fastidiosa*, o inseto se contamina com a bactéria, transmitindo-a para plantas saudáveis nas alimentações subsequentes (Redak et al., 2004; Chatterjee et al., 2008b; Nadarasah e Stavrínides, 2011; Backus et al., 2012). Logo após ingestão pelo inseto, as bactérias se localizam na parte anterior do intestino desse, aderidas ao forro cuticular do cibário (Hill e Purcell, 1995).

A transmissão de *X. fastidiosa* através do inseto vetor tem características bem

específicas para um sistema de disseminação desse tipo, haja vista que essas bactérias se multiplicam no vetor sem adentrar seu sistema circulatório (Purcell e Finlay, 1979); o fato de a bactéria se multiplicar dentro do inseto permite que, após a primeira aquisição a partir de uma planta infectada, o inseto ainda seja capaz de transmitir bactérias por meses (Hill e Purcell, 1995). Além disso, *X. fastidiosa* não necessita de um período de latência no inseto antes de estar apta a ser transmitida para outras plantas (Purcell e Finlay, 1979). Foi proposto que as células de *X. fastidiosa*, uma vez no inseto, também devem se organizar em um biofilme que garantiria a elas tanto maior estabilidade em um meio turbulento, com fluxo em alta velocidade, assim como uma maior eficiência de captação de nutrientes a partir de uma solução muito diluída (Hopkins, 1977; Chatterjee *et al.*, 2008b; Backus *et al.*, 2012).

A eficiência de transmissão de bactérias pelo vetor parece estar relacionada mais com o tamanho da população microbiana do que com a interação inseto-bactéria (Hill e Purcell, 1997). De fato, não há especificidade de interação com o inseto, de forma que várias espécies diferentes transmitem eficientemente cepas diversas de *X. fastidiosa* (Redak *et al.*, 2004). A falta de especificidade entre vetor e cepa bacteriana sugere que o inseto não se beneficia dessa associação, enquanto que por outro lado, a colonização do pré-cibário pode afetar a alimentação do inseto (Chatterjee *et al.*, 2008b; Backus *et al.*, 2012).

1.2.1. Mecanismos de patogenicidade e virulência de *X. fastidiosa*

Após o trabalho pioneiro de sequenciamento e anotação do genoma da cepa 9a5c de *X. fastidiosa* (Simpson *et al.*, 2000a), a qual foi isolada de laranjeiras e comprovadamente associada à CVC (Li *et al.*, 1999), genomas de outros 7 isolados/cepas/linhagens foram completa ou parcialmente sequenciados: cepa Temecula-1, isolada de videiras e agente etiológico da doença de Pierce; cepas Dixon, M12 e M23, associadas à escaldadura da amendoeira, cepa Ann-1 agente causal da escaldadura da espiroleira, cepa GB514, isolada de videira e cepa (Simpson *et al.*, 2000a; Bhattacharyya *et al.*, 2002a; Bhattacharyya *et al.*, 2002c; Van Sluys *et al.*, 2003a; Chen *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). A análise do repertório de genes previamente anotados no genoma da cepa 9a5c (Simpson *et al.*, 2000a) seguida por estudos comparativos *in silico* dos genomas de diferentes cepas de *X. fastidiosa*, além de análises de transcriptômica e de polimorfismos genéticos, entre outras, possibilitou a identificação de vários genes potencialmente relacionados a processos de adaptação, patogenicidade e virulência nessa bactéria (Bhattacharyya *et al.*, 2002a; Bhattacharyya *et al.*, 2002c; de Souza *et al.*, 2003; Van Sluys *et al.*, 2003a; Setubal *et al.*, 2005; Doddapaneni *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2008a; de Mello Varani *et al.*, 2009).

O desenvolvimento da doença causada por *X. fastidiosa* depende da habilidade do patógeno de se espalhar a partir do ponto de infecção e ultimamente desenvolver uma população sistêmica na planta (Chatterjee *et al.*, 2008b); de fato, estudos mostram que a resposta da planta parece ser dependente de uma extensa colonização bacteriana (Krivanek *et al.*, 2005; Fritschi *et al.*, 2007).

Apesar de *X. fastidiosa* ser uma bactéria aflagelada, essa bactéria tem a capacidade de se espalhar pelos vasos xilemáticos do hospedeiro vegetal, movimentando-se tanto horizontalmente, ao longo do vaso, como verticalmente, entre vasos. Nos vários genomas de linhagens de *X. fastidiosa* já anotados encontram-se genes responsáveis pela montagem do pilus do tipo IV, ou pilus longo, (Simpson *et al.*, 2000b; Van Sluys *et al.*, 2003b), o qual está envolvido em motilidade e migração (Chatterjee *et al.*, 2008b; Janse e Obradovic, 2010). Já foi demonstrado que *X. fastidiosa* tem seu pilus do tipo IV funcional, localizado em um dos polos da célula, de forma que mutantes para genes que codificam para componentes desse complexo motor apresentam perda de motilidade e inibição de movimento basipetal *in planta* (Meng *et al.*, 2005).

As plantas infectadas por *X. fastidiosa* apresentam os vasos do xilema bloqueados por agregados celulares bacterianos, os quais são adensados pela presença do exopolissacarídeo (goma) secretado pela bactéria, formando um biofilme bacteriano no vaso xilemático (Alves *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2004; Roper *et al.*, 2007b; Francis *et al.*, 2008). Assim, os sintomas das plantas infectadas por *X. fastidiosa* parecem estar relacionados aos estresses hídrico e/ou nutricional decorrentes da oclusão do xilema (Purcell e Hopkins, 1996; Hopkins e Purcell, 2002; Chatterjee *et al.*, 2008a). Há um número elevado de evidências que apontam que os sintomas associados às doenças causadas por *X. fastidiosa* deve mais à proporção de vasos com grandes agregados celulares do que ao número de vasos colonizados (Chatterjee *et al.*, 2008b; Janse e Obradovic, 2010).

A formação de biofilme é uma característica associada a bactérias, sendo que cerca 90% das células bacterianas existentes devem estar em biofilme (Petrova e Sauer, 2012). O biofilme corresponde a um agregado de células bacterianas aderidas entre si e a um substrato, envoltas em uma matriz exopolimérica composta majoritariamente de exopolissacarídeos, além de DNA, proteínas e lipídeo (Costerton *et al.*, 1995; Morris e Monier, 2003; Flemming e Wingender, 2010). Os biofilmes são sistemas biológicos estruturalmente e dinamicamente complexos que garantem vantagem adaptativa aos organismos que contém. A formação do biofilme garante às células vantagens contra situações ambientais adversas, como exposição à radiação UV, toxicidade a metal, exposição a ácido, desidratação, estresse osmótico, fagocitose e vários antibióticos e agentes antimicrobianos (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

O biofilme de *X. fastidiosa* se desenvolve num processo sequencial muito semelhante ao observado para outras bactérias, iniciado com adesão das células ao substrato, formação de microcolônias, começo da maturação do biofilme em torno do décimo dia de desenvolvimento, estando o biofilme está maduro após cerca de 20 dias. Uma vez maduro, o biofilme pode se desmembrar, na etapa de dispersão (de Souza *et al.*, 2004; Caserta *et al.*, 2010a). Encontra-se anotado no genoma de cepas de *X. fastidiosa* uma quantidade relativamente alta de genes que codificam para proteínas de adesão, como componentes do pilus do tipo I e outras adesinas afimbrias. Essas proteínas têm papel muito importante na adesão inicial das células a um substrato e posterior formação de biofilme (Chatterjee *et al.*, 2008b; Janse e Obradovic, 2010).

Os exopolissacarídeos (EPS), principais componentes do biofilme bacteriano, já foram apontados como essenciais para a colonização e desenvolvimento de sintomas para algumas bactérias fitopatogênicas, como *Ralstonia solanacearum*, *Pantoea stewartii* e *Xanthomonas campestris* (Denny, 1995; Morris e Monier, 2003; Rigano *et al.*, 2007). Foi predito que *X. fastidiosa* deve sintetizar um EPS parecido com o de *Xanthomonas* spp. Esse EPS deve consistir de unidades repetidas de tetrassacarídeos polimerizados reunidos pela adição sequencial de glicose-1-fosfato, glicose, manose e ácido glucurônico (da Silva *et al.*, 2001). Roper e colaboradores (2007) observaram que o EPS é um componente substancial do biofilme maduro de *X. fastidiosa*, podendo estar associado à oclusão de vasos associada ao desenvolvimento de sintomas na doença de Pierce, causada pela cepa Temecula. O EPS de *X. fastidiosa*, dessa forma, parece ter um papel importante na estruturação do biofilme mais do que na adesão inicial de células à superfície. Os dados apresentados nesse trabalho são corroborados por um outro trabalho em que foram construídas linhagens de *X. fastidiosa* mutantes para genes da via de síntese de EPS; os autores observaram que os mutantes retinham a capacidade de se aderir a substrato, mas falhavam na formação de biofilme (Souza *et al.*, 2006).

Os EPS, componentes do biofilme bacteriano, além de serem importantes para adesão e estruturação do biofilme, estão associados a grande parte das vantagens adaptativas oferecidas às células localizadas no biofilme, como na ligação e neutralização de agentes antimicrobianos, proteção contra radiação ultravioleta e desidratação (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Flemming *et al.*, 2007; Flemming e Wingender, 2010). Ainda, eles podem ter papel na ligação e estabilização de proteínas extracelulares, e podem ser utilizados para fins nutritivos pelas bactérias que compõem o biofilme. Rodrigues e colaboradores (2008) mostraram que células do biofilme de *X. fastidiosa* apresentam maior resistência a cobre, metal usado em produtos antimicrobianos para agricultura, sendo que a quantidade de EPS no biofilme das células estudadas parecia estar diretamente relacionado a esse aumento de resistência (Rodrigues *et al.*, 2008b). Também foram encontradas no

genoma de *Xylella* endoglucanases capazes de degradar o EPS produzidos pela bactéria, não podendo ser descartada a possibilidade de utilização, por *X. fastidiosa*, de componentes da matriz extracelular que compõem seu biofilme como fonte nutricional (Simpson *et al.*, 2000b; Roper *et al.*, 2006; Wulff *et al.*, 2006). Já foi apontado também que os EPS podem favorecer a sobrevivência de bactérias fitopatogênicas na planta por evitar o reconhecimento do patógeno pela planta por proteger a população de bactérias contra compostos antimicrobianos produzidos pela planta e por sua capacidade de retenção de água (Roberson e Firestone, 1992).

Além do que já foi mencionado, outros aspectos da biologia de *X. fastidiosa* são importantes quando se considera a patogenicidade e virulência dessa bactéria. As bactérias fitopatogênicas já descritas utilizam-se de sistemas de secreção específicos para exportar proteínas com funções diversas durante o processo de infecção (Van Sluys *et al.*, 2002; Saier, 2006). Esses sistemas são numerados de I a VI, sendo que os quatro primeiros são apontados como determinantes majoritários de patogenicidade para patógenos de plantas (Stravrinides, 2009)

Interessantemente, observou-se em análises genômicas que *X. fastidiosa* não possui sistema de secreção do tipo III (SST3), assim como efetores desse sistema (ESST3) (Dow e Daniels, 2000; Bhattacharyya *et al.*, 2002b; Bhattacharyya *et al.*, 2002d). Esse sistema de secreção exporta diretamente para o citoplasma de células do hospedeiro, proteínas envolvidas principalmente na modulação da resposta de defesa do hospedeiro vegetal (Alfano e Collmer, 2004; Chisholm *et al.*, 2006). A ausência desse tipo de sistema de secreção em *X. fastidiosa* deve estar relacionada com o fato de essa bactéria não infectar tecidos vivos na planta (Chatterjee *et al.*, 2008b)

Com exceção do SST3, *X. fastidiosa* apresenta todos os outros principais sistemas de secreção, todos eles provavelmente desempenhando papel relevante no estabelecimento da infecção (Chatterjee *et al.*, 2008b; Janse e Obradovic, 2010; Vojnov *et al.*, 2010). O sistema de secreção do tipo I (SST1) está associado a resistência a compostos tóxicos, através de bombas de efluxo de multídrogas, e secreção de hemolisinas (da Silva *et al.*, 2004; Lubelski *et al.*, 2007). Em um trabalho em que foi construída uma linhagem de *X. fastidiosa* mutante para um dos genes do SST1, *tolC*, observou-se que as linhagens apresentavam perda severa de virulência em videira, apontando um papel muito importante desse sistema para a patogenicidade de *X. fastidiosa* (Reddy *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008b). O sistema de secreção do tipo II (SST2) é importante para a virulência de várias bactérias fitopatogênicas, estando relacionado com a secreção de enzimas extracelulares que hidrolizam componentes diferentes da parede celular de plantas (Dow *et al.*, 1987; Hu *et al.*, 1992; Ray *et al.*, 2000). O genoma de *X. fastidiosa* apresenta todos os genes essenciais para montagem desse sistema de secreção, assim como genes para enzimas

extracelulares, efetores putativos desse sistema de secreção (Simpson *et al.*, 2000b; Van Sluys *et al.*, 2003b; Jha *et al.*, 2005). Um das funções dessas enzimas seria a degradação das pontuações de membranas que conectam vasos xilemáticos adjacentes, permitindo que a bactéria colonize vasos “novos” (Roper *et al.*, 2007c; Perez-Donoso *et al.*, 2010). Ainda, essas enzimas podem ter papel de mobilização de nutrientes a partir da parede celular vegetal ou mesmo de supressão de defesas do hospedeiro vegetal (Chatterjee *et al.*, 2008b; Vojnov *et al.*, 2010). O sistema de secreção do tipo IV (SST4) está envolvido com a exportação, para o citoplasma do hospedeiro, de moléculas de DNA, em *Agrobacterium*, e de toxina, em *Bordetella pertussis*; apesar de esse sistema estar completo em *X. fastidiosa*, pouco se sabe sobre sua relevância para patogenicidade/virulência de *X. fastidiosa* (Vojnov *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que vários dos fatores relacionados à virulência brevemente discutidos aqui são controlados pelo acúmulo de DSF (*Diffusible Signaling Factor*) uma pequena molécula sinalizadora (ácido 12-metil-tetradecanóico ou ácido cis-11-metil-2-dodecenóico) cuja síntese acompanha o aumento da densidade celular, como ocorre com diversos outros fitopatógenos (Simpson *et al.*, 2000a; da Silva *et al.*, 2001; Scarpari *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Colnaghi Simionato *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2008c; Dow, 2008; Newman *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012). Esse mecanismo em que um fator difusível tem papel regulatório baseado no tamanho da população bacteriana é chamado de “percepção de quorum” (do inglês, *quorum sensing*) (Bassler e Losick, 2006; Jayaraman e Wood, 2008).

1.3. Importância dos sistemas de homeostase de ferro para virulência de bactérias

De um modo geral, as bactérias regulam o metabolismo do ferro em resposta à disponibilidade desse metal no ambiente. Em *E. coli*, assim como em muitas outras bactérias, a carência de ferro promove a expressão de dezenas de unidades transcricionais que codificam, por exemplo, para componentes do sistema de captação e armazenamento de ferro e do sistema de proteção ao efeito tóxico deste metal. Além disso, os patógenos frequentemente utilizam os baixos níveis de ferro no ambiente como um sinal para a indução de genes de virulência (Litwin e Calderwood, 1993; Escolar *et al.*, 1999; Ratledge e Dover, 2000; Andrews *et al.*, 2003a).

Diversos estudos já demonstraram que a aquisição de ferro é uma etapa crucial no estabelecimento de infecções em animais, tanto por bactérias Gram-positivas quanto por Gram-negativas, como, por exemplo, as pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia* e *Pseudomonas* (Heinrichs *et al.*, 1999;

Bullen *et al.*, 2000; Andrews *et al.*, 2003a). Este processo é de igual importância na colonização de plantas pelas bactérias dos gêneros *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (Masclaux e Expert, 1995; Expert *et al.*, 1996; Wiggerich e Puhler, 2000).

Por exemplo, para que o fitopatógeno *Dickeya dadantii* (anteriormente *Erwinia chrysanthemi*) prolifere na violeta africana (*Saintpaulia ionantha*), é necessário um sistema de assimilação de ferro que compreende aproximadamente 25 produtos gênicos envolvidos na biossíntese, excreção e assimilação do sideróforo crisobactina. A expressão destes genes é co-regulada com a de genes de biossíntese de pectinases, envolvidas na degradação da parede celular (Enard *et al.*, 1988). Mutantes de *Erwinia* em que genes do sistema de absorção de ferro por crisobactina foram nocauteados tiveram sua capacidade invasiva reduzida, produzindo apenas lesões locais e não sistêmicas, ou tiveram um atraso de um ou dois dias no aparecimento de sintomas na planta, ou ainda, não produziram sintomas na planta (Enard *et al.*, 1988; Masclaux e Expert, 1995; Enard e Expert, 2000). Fenótipos semelhantes foram também observados quando genes da via de transporte de ferro mediada por desferrioxamina E (DFO), um sideróforo produzido por *Erwinia amylovora* (Dellagi *et al.*, 1998) e o gene *fur* (Franza *et al.*, 1999) foram inativados. Em outro trabalho, Franza e colaboradores mostram que outro sideróforo sintetizado pela cepa 3937 de *Dickeya dadantii*, acromobactina, juntamente com crisobactina, é essencial para o processo de infecção (Franza *et al.*, 2005). Também foi avaliada a relevância de proteínas semelhantes a ferritina, responsáveis por armazenamento de ferro, para virulência de *Dickeya dadantii*, observando que mutantes para a proteína bacterioferritina apresentavam virulência atenuada (Boughammoura *et al.*, 2008).

No fitopatógeno *X. campestris* pv. *campestris*, que causa podridão negra de crucíferas, foi demonstrado que os genes *tonB*, *exbB* e *exbD1*, que codificam para proteínas que compõem o sistema de captação de complexos sideróforo-Fe³⁺ e são integrantes do regulon do ferro em outras bactérias, são essenciais para indução de resposta hipersensitiva em pimenta (*Capsicum annum*) e em couve-flor (*Brassica oleraceae*) (Wiggerich e Puhler, 2000). Em um trabalho recente com *X. oryzae* pv. *oryzae*, pesquisadores nocautearam genes para via de síntese de sideróforos e para a proteína FeoB, responsável por importação de ferro reduzido livre, e analisaram o fenótipo de virulência desses mutantes. Observou-se que não houve perda de virulência nos mutantes para via de síntese de sideróforo, enquanto que as linhagens nocauteadas para a proteína FeoB apresentaram fenótipo severo de redução de virulência (Pandey e Sonti, 2010). Ainda, outro trabalho mostra que a proteína reguladora Fur é relevante para a virulência de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Jittawuttipoka *et al.*, 2010).

Outro fitopatógeno em que já foi estudada a relevância de sistemas envolvidos na homeostase de ferro para a virulência é a bactéria *Pseudomonas syringae*. Foram

---

observados que mutantes para síntese de pioverdina em *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 apresentaram perda de virulência, enquanto que mutantes para síntese e captação de três sideróforos diferentes (pioverdina, yersiniabactina e citrato) em *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mantiveram-se virulentos (Taguchi *et al.*, 2010; Jones e Wildermuth, 2011). Mutantes para a proteína Fur em *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528 apresentaram redução de virulência, enquanto para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 não foi possível isolar clones viáveis mutantes para o gene Fur (Cha *et al.*, 2008; Butcher *et al.*, 2011).

Dessa forma, pode-se dizer que a homeostase de ferro apresenta-se igualmente importante para virulência de bactérias fitopatogênicas assim como para as que são patógenos de animais. As diferenças encontradas em vários estudos sobre bactérias fitopatogênicas em relação à relevância de sistemas específicos de captação, armazenamento e regulação da homeostase de ferro para a virulência dessas bactérias refletem, além da relevância da captação desse metal, também os diferentes mecanismos de infecção apresentados por diferentes bactérias, juntamente com as prováveis diferenças encontradas pelas mesmas em seus diferentes hospedeiros vegetais.

---

2. Objetivos

Neste trabalho tivemos como objetivos entender melhor o processo de captação de ferro em *X. fastidiosa* e investigar o comportamento desta bactéria em cultivo com diferentes concentrações de ferro, na expectativa de que os resultados obtidos possam contribuir para o conhecimento sobre o metabolismo de ferro em *X. fastidiosa* e sua possível relação com a virulência e patogenicidade. Assim, neste trabalho investigamos a eventual produção de sideróforo por *X. fastidiosa* e o perfil de expressão de genes potencialmente relacionados a síntese desses compostos. Também avaliamos o crescimento e formação de biofilme por *X. fastidiosa* cultivada em meios com baixa e alta concentração de ferro.

Em trabalho anteriormente realizado em nosso grupo (Zaini, 2007a; Zaini *et al.*, 2008b) foi observado que a exposição de *X. fastidiosa*, cepa 9a5c, a concentrações variantes de ferro altera dramaticamente o nível de transcritos de aproximadamente 600 genes. Como esperado, o nível de transcritos de vários genes potencialmente relacionados ao metabolismo de ferro foi modulado em resposta a variação na concentração de ferro do meio. Transcritos de genes relacionados à aquisição de ferro tiveram níveis aumentados quando as células foram expostas a concentração limitante de ferro. Por outro lado, genes relacionados ao armazenamento de ferro e proteção de danos causados pela exposição ao excesso deste metal apresentaram níveis aumentados de seus transcritos quando as células foram expostas a alta concentração de ferro. A exposição a diferentes concentrações de ferro também provocou variação do nível de transcritos de genes que codificam para proteínas associadas à virulência e patogenicidade, tais como proteínas do pilus tipo IV e microcinas, revelando que o stimulon do ferro em *X. fastidiosa* compreende outros genes além daqueles tipicamente associados a homeostase do ferro. Por outro lado, ainda não está esclarecido como se dá a captação de ferro por *X. fastidiosa*, ainda que dados já publicados sugiram que esta bactéria produza um composto quelante de ferro com características de um sideróforo bacteriano (Silva-Stenico *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2006; Simionato *et al.*, 2010)

3. Procedimentos experimentais

3.1. Manutenção e cultivo de *X. fastidiosa*

As culturas de células de *Xylella fastidiosa* cepa 9a5c (Li *et al.*, 1999) foram feitas em meio complexo PW (Davis *et al.*, 1981) modificado (PWG). O meio PWG é constituído de fitona peptona 4g/L; peptona de caseína com digestão triptica 1g/L; cloreto de hemina 0,001%; K₂HPO₄ 1,2g/L; KH₂PO₄ 1g/L; MgSO₄.7H₂O 0,4g/L; glutamina 0,4% e glicose 0,5%. A manutenção das culturas foi feita em placas de meio PWG-ágar (PWG-contendo ágar 1,5%) com repiques semanais e incubação a 28°C, sendo o número de passagens controlado. Para o cultivo em meio líquido, as bactérias, após 7 dias de crescimento em meio sólido, foram transferidas para meio PWG e mantidas a 28°C com 100 rpm de agitação por mais 7 dias. Após esse período, as células foram submetidas a tratamentos/condições de cultivo variados. Estoques de células (diversas passagens) foram mantidos em PWG contendo 50% de glicerol em freezer a -80°C.

3.2. Quantificação da captura de citrato férrico

Para avaliar a capacidade de captura de citrato férrico por *X. fastidiosa* cepa 9a5c, medimos a quantidade de ferro associada a culturas celulares como proposto por (Bronstein *et al.*, 2008). Brevemente, culturas crescidas por 7 dias em meio PWG sem adição de ferro (meio PWG sem hemina, referido ao longo desse trabalho como meio LI, do inglês Low Iron, pouco ferro) receberam citrato férrico, concentração final de ~45 µM, ou citrato de sódio (tratamento controle) na mesma concentração. No início do tratamento (tempo 0) e após 30 min e 15 h, as células foram centrifugadas, 4000 g por 10 min, e o sedimento obtido foi lavado com água milli-Q. O processo de centrifugação e lavagem foi repetido três vezes para reduzir contaminação do ferro contido no meio de cultura. As células sedimentadas foram então congeladas, liofilizadas e enviadas para dosagem de ferro total por espectrometria de emissão ótica com acoplamento de plasma induzido (ICP-AES) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os dados de concentração obtidos foram normalizados pela densidade ótica das culturas, medida a 600nm, antes da primeira centrifugação.

3.3. Detecção da produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada pelo método universal de detecção desses compostos, utilizando o reagente *chrome azurol sulfonate* (CAS), como proposto por (Schwyn e Neilands, 1987). Para estes ensaios, foram preparados meio PWG com o reagente CAS (PWG-CAS) e meio PWG-CAS com adição de 2,2'-dipiridil (DP),

concentração final de 200 μM (PWG-CAS-DP). O ensaio para detecção de sideróforo também foi realizado em meio PIM-6 (PIM6-CAS). O meio PIM-6 é um novo meio de cultivo recentemente desenvolvido para *X. fastidiosa* e que mimetiza a seiva do xilema (Michele Igo, University of California, Davis, dados não publicados).

Uma pequena porção de *X. fastidiosa* previamente crescida em meio PWG sólido foi homogeneizada em meio PWG líquido, obtendo-se uma suspensão de células. Essa suspensão foi plaqueada nos meios PWG-CAS, PWG-CAS-DP (cepa 9a5c) e PIM-6-CAS (cepa Temecula). As placas foram mantidas no escuro, a 28°C, e avaliadas em relação à formação de um halo amarelado ao redor da colônia bacteriana, indicativo de reação de sideróforo produzido pela bactéria com o reagente CAS (Schwyn e Neilands, 1987). Foi observado formação de halo a partir de 3 dias, ficando bem evidente após 7 dias. Como controle negativo foi utilizada placas de meio com reagente CAS sem inoculação de bactéria. Nessas placas não foi observada mudança de cor decorrente de reação do reagente CAS.

3.4. Curva de crescimento de *X. fastidiosa* em diferentes concentrações de ferro

Para acessar a resposta de *X. fastidiosa* a diferentes biodisponibilidades de ferro, realizamos curvas de crescimento em cinco meios de cultura diferentes: 1) PWG, meio padrão, contém cloreto de hemina 0,001% como fonte de ferro (referido ao longo do texto como meio CT); 2) meio PWG padrão com adição de quelante de íon ferroso 2,2'-dipiridil, concentração final de 200 μM (meio NI, do inglês *No Iron*, sem ferro); 3) meio PWG padrão sem cloreto de hemina (meio LI); 4) meio PWG padrão sem adição de cloreto de hemina, com adição do quelante de íon ferroso 2,2'-dipiridil para concentração final de 100 μM (meio VLI, do inglês *Very Low Iron*, muito pouco ferro); 5) meio PWG com adição de 100 μM de pirofosfato férrico (meio HI, do inglês *High Iron*, muito ferro). Para fins de controle, a concentração de ferro total nos meios utilizados foi quantificada por ICP-AES na Central Analítica do IQ-USP.

Para iniciar a curva de crescimento nos diferentes meios, culturas de *X. fastidiosa* crescidas por 7 dias em meio líquido PWG foram submetidas à centrifugação por 10 min a 4000 g, o sobrenadante foi parcialmente descartado, as células sedimentadas foram ressuspendidas no volume restante e rapidamente transferidas para os diferentes meios, sendo que o volume de células transferido era o suficiente para atingir $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,07 \pm 0,02$. A suspensão de células na $\text{DO}_{600\text{nm}}$ desejada foi então separada em alíquotas de 10 mL em tubos de poliestireno de 50 mL. Os diferentes tubos eram referentes aos sete pontos avaliados na curva de crescimento: 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 20 dias.

As células crescidas nos diferentes meios foram analisadas em relação à multiplicação celular e formação de biofilme.

3.4.1. Multiplicação celular

Para análise de multiplicação celular foram utilizadas apenas as células planquitônicas. Foram realizadas leituras de densidade celular a 600nm nos pontos 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 20 dias de cultivo das células. As leituras foram feitas em triplicata, sendo a DO_{600nm} zerada com o meio específico em que cada cultura foi crescida (Pashalidis *et al.*, 2005; Zaini *et al.*, 2008b).

O crescimento celular também foi avaliado por análise da concentração de proteína total nas amostras, pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Para tal análise, 1mL de células planquitônicas foi centrifugado por 10 min a 13000 rpm, e depois ressuspensionado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As células ressuspensionadas foram sonicadas, 3 ciclos de 15 segundos de sonicação, com intervalos de um minuto entre cada sonicação. Para a dosagem de proteínas totais utilizou-se 10 µL do lisado celular.

3.4.2. Formação de biofilme

Para análise de formação de biofilme foi utilizado o método de coloração com o reagente cristal violeta, como descrito por (Zaini *et al.*, 2009; Fogaca *et al.*, 2010). Brevemente, o biofilme depositado na interface ar-meio foi lavado com água destilada, corado por 20 min com o reagente cristal violeta 0,1%, lavado novamente com água destilada e depois removido e homogenizado em acetona/etanol em proporção 6:4. O homogenizado teve absorbância medida a 595 nm.

3.5. Crescimento e formação de biofilme em meio mínimo com diferentes concentrações de ferro

O crescimento e a formação de biofilme também foram avaliados no meio mínimo PIM-6 contendo 100 µM de 2,2'-dipiridil (PIM-6 + DP) ou 100 µM de pirofosfato férrico (PIM-6 + PP) para simular condição de baixa e alta concentração de ferro, respectivamente. Culturas de *X. fastidiosa* crescidas por sete dias em meio PWG líquido foram centrifugadas por 10 min a 4000 g e o sobrenadante foi parcialmente descartado. As células sedimentadas foram ressuspensionadas no volume restante e rapidamente transferidas para meios novos referentes aos tratamentos, no caso os meios PIM-6, PIM-6 + DP e PIM-6 + PP. O volume de células transferido era o suficiente para que a DO_{600nm} do meio novo ficasse com valor $0,07 \pm 0,02$. O meio novo contendo células na DO_{600nm} desejada foi aliquoteado, 10 mL, em 2

---

tubos de poliestireno de 50 mL para avaliação do crescimento e formação de biofilme após 5 e 7 dias. A multiplicação celular e a formação de biofilme foram avaliadas como descritos nos itens 3.5.1. e 3.5.2.

3.6. Dosagem de exopolissacarídeos totais associados ao biofilme

Para dosar a concentração de exopolissacarídeos totais depositados no biofilme de *X. fastidiosa* utilizamos culturas bacterianas crescidas por 7 e 10 dias nos meios PWG, VLI e HI. As células planquitônicas foram removidas e o biofilme depositado na interface ar-meio foi mantido. O tubo foi lavado duas vezes com água milli-Q autoclavada para remoção de células planquitônicas restantes. Em seguida foi adicionado 3 mL de meio PWG para homogenizar o biofilme. O biofilme ressuspensionado foi avaliado em relação à concentração de exopolissacarídeos pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), utilizado para dosagem de açúcares totais (Brummer, 2005). Para isso, uma alíquota de 1mL do biofilme ressuspensionado foi submetida à centrifugação a 13000 *g* por 10 min, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com água milli-Q e então utilizado no experimento. Também foi feita análise de densidade celular do biofilme ressuspensionado através de leituras espectrofotométricas a 600 nm. Os dados de densidade celular foram utilizados para normalização dos resultados de concentração de açúcares totais no biofilme.

3.7. Análise da morfologia do biofilme

3.7.1. Observação em lupa estereoscópica

Para análise da morfologia do biofilme depositado na interface ar-meio, culturas de *X. fastidiosa* nos meios PWG, VLI e HI foram preparadas em potes de vidro estéreis contendo lâminas de microscopia ótica comuns aderidas e mantidas submersas no meio de cultura (Figura 3). Após 4 dias de crescimento, as lâminas foram retiradas para observação do biofilme em lupa estereoscópica. Para melhor visualização do biofilme, as lâminas também foram coradas com reagente cristal violeta, como descrito no item 3.5.2.

Figura 3. Pote de vidro com lâminas de vidro aderidas para análise morfológica de biofilme de *X. fastidiosa*.

3.7.2. Visualização por microscopia eletrônica de varredura

Para análise da morfologia do biofilme por microscopia eletrônica de varredura, culturas de *X. fastidiosa* nos meios CT, VLI e HI foram preparadas em potes de vidro estéreis (figura 3) contendo lâminulas de borossilicato aderidas e mantidas parcialmente submersas no meio de cultura. Após 7 dias de crescimento, as lamínulas foram retiradas e o biofilme foi fixado com glutaraldeído 2,5% (v/v) por 1 h. As lamínulas foram então submetidas a 4 lavagens por 10 min com tampão catecolato 0,1M pH 7,2. As amostras foram então gentilmente submersas em tampão tetróxido de ósmio 1% por 1 h, lavadas 3 vezes com tampão catecolato, tratadas com ácido tânico 1% por 30 min e lavadas duas vezes com água deionizada. Em seguida, as amostras foram impregnadas com tetróxido de ósmio por 30 min, lavadas novamente com água deionizada por três vezes e desidratadas gradualmente pela incubação por 10 min com concentrações crescentes de etanol. Após secagem em ponto crítico, as amostras foram recobertas com uma camada de ~25nm de ouro e mantidas desidratadas até serem observadas em microscópio eletrônico de varredura modelo FEI Quanta FEG 250 no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo.

3.8. Avaliação da Agregação Celular

A taxa de agregação celular de *X. fastidiosa* foi medida por decaimento da densidade ótica a 600nm por 4 h. Culturas crescidas por 8-10 dias (fase estacionária) em meio PWG foram submetidas a centrifugação a 4000 g por 10 min, ressuspensas em pequeno volume de meio e transferidas para os meios PWG, VLI e HI de modo a obter alta densidade celular final ($DO_{600nm} = 0,8 \pm 0,1$). Após 12 h de tratamento, as culturas foram normalizadas para

$DO_{600nm}=0,8\pm0,05$, seguindo-se medida da DO_{600nm} por 4 h, em intervalos de 5 min. Os dados gerados foram avaliados em relação a variação de absorbância por tempo.

3.9. Análise de expressão gênica por RT-qPCR

3.9.1. Isolamento de RNA total

Após exposição a condições variadas de cultivo, as células de *X. fastidiosa* foram submetidas a centrifugação a 4000 *g* por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Em seguida o sedimento foi tratado com os reagentes TRIzol (Invitrogen) e clorofórmio previamente à purificação do RNA com PureLink™RNA Mini Kit (Life Technologies) seguindo instruções do fabricante. A quantificação e análise qualitativa do RNA obtido foram obtidas através da determinação das absorbâncias (Abs) a 260nm e 280nm em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies), sendo que $Abs_{260nm}=1$ corresponde a 40µg de RNA em 1 mL de solução quando a razão $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}\cong 1,9$. A integridade do RNA total foi avaliada no equipamento BioAnalyzer (Agilent), que permite a avaliação de amostras com concentrações de RNA entre 0,5–50 ng/µL.

3.9.2. Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa (RT-qPCR)

Amostras de RNA que apresentaram concentração, pureza e integridade adequadas foram submetidas a tratamento com RQ1 RNase-free DNase (Promega) ou DNase I Amplification Grade (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante, para eliminar eventual contaminação com DNA genômico. Após o tratamento, as amostras foram submetidas a um ensaio teste de RT-qPCR para verificação da eficiência do tratamento com DNase. O tratamento foi considerado eficiente quando as amostras não apresentaram amplificação ou apresentaram amplificação tardia, depois do ciclo 34 de reação. Amostras consideradas livres de DNA foram utilizadas para síntese de cDNA a partir de 4 µg de RNA total pré-tratado com DNase, 2 µL de iniciadores randômicos (~210 ng), 1 µL da mistura de dNTP 10 mM e água livre de contaminação com RNase para um volume final de 48 µL. A reação foi incubada a 65°C durante 5 min e em seguida transferida para o gelo imediatamente por pelo menos 1 minuto. Em seguida foram adicionados 16 µL de tampão 5x para a síntese de primeira fita do cDNA, 1 µL de DTT (Ditiotreitol) 0,1 M, 1 µL de RNase OUT (20 U) e 1 µL (200 U) da enzima transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen). A reação foi incubada a 25°C por 10 min e em seguida a 42°C por 50 min. A inativação da reação foi realizada através de incubação a 70°C durante 15 min. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C até o uso. Para cada reação de RT-qPCR foram utilizados 50 ng de cDNA, 8µL da mistura de iniciadores (direto e reverso) específicos para cada CDS (Tabela

1), o que corresponde a uma concentração de 800nM, e 10µL do fluoróforo (SYBR Green 2x, Applied Biosystems).

Os ensaios de RT-qPCR em tempo real para os genes (CDS) de *X. fastidiosa* cepa 9a5c potencialmente regulados por variações na concentração de ferro no meio de cultivo foram realizados com iniciadores específicos visando à geração de produtos com tamanho de aproximadamente 150 pares de bases. Os iniciadores direto e reverso para cada uma das CDS selecionadas foram planejados com o auxílio do programa Primer3 (Rozen e Skaletsky, 2000), disponível em <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>. Os pares de iniciadores listados na Tabela 1 foram testados previamente em relação à eficiência e especificidade de amplificação. Para tal, realizamos reações de qPCR utilizando como molde DNA purificado de *X. fastidiosa*, para verificar a eficiência de amplificação; a análise das curvas de dissociação geradas permitiu verificar a especificidade dos pares de iniciadores. Todos os pares de iniciadores planejados apresentaram bom espectro de amplificação e uma curva de dissociação com apenas um pico (dados não mostrados), indicando que todos eram específicos para as sequências para as quais foram desenhados.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para as reações de RT-qPCR

CDS	
XF0772	F: TGGTGTGCTTGAGTTGTGTG R: ACGCGTAACCCAAAAGATTG
XF0775	F: CAATGGTTGCGTTGCTTGTG R: GTGCACCCCAGGAACATCAT
XF0933	F: CCGCCGGATGTGTTGGT R: TTCCAGTACAAAACGCAAATGC
XF1038	F: GGGAGGTATTTGGTTCTACTGA R: CGTGTCCATGCTTGTTTCATACA
XF1726	F: GGCTGTGCATGAAGTACGAG R: CATGCTTGGAAGCGATGTAG
XF2094	F: CGGTACCATCGTGTTCTCCAT R: GACCGTGATCATGCCGATTT
XF2134	F: GCCAGCTTGATCTCACCACAA R: GTGCTGCTGGCTGTGTGACT
XF2135	F: TTTGGAGCGCTTTTACAGTG R: GCTAAAGGCGCCAAAATATC
XF2157	F: GGTGCCGAAGTATTATTCACA R: CAACCGCGATAACTCGTAATCAA
XF2255	F: TGGATCACTGGACGTGTGGAT R: ACGAGTGTGCTTTTCGATTTTCG
XF2276	F: CGTGCGTTGGTCATGTGATC R: CACTCTTCAATCCCCTCATCATC
XF2347	F: ATTCAAGCGTTTGGAAGGAC R: ACTCCAGCCTCAAAGTACC

Para todas as reações foram incluídos controles negativos dos iniciadores utilizados, em que as reações de amplificação foram feitas sem cDNA, substituído por água Milli-Q, para garantir a ausência de DNA contaminante nas soluções de iniciadores. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador em tempo real (Applied Biosystems, modelo Gene Amp 7300), utilizando-se o seguinte programa: 2 min a 50°C, 2 min a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. O *software* do equipamento gera curvas de amplificação e dissociação dos iniciadores para cada amostra analisada e oferece o cálculo automático do Ct (*Cycle Threshold*), que corresponde ao número de ciclos de reação realizados até que a amplificação seja detectada a partir da emissão de fluorescência. A quantidade de cDNA das amostras foi normalizada de acordo com a expressão do gene controle (*dnaQ*; XF2157) como descrito por (Zaini *et al.*, 2008b). A relação entre a expressão do gene de interesse e a expressão do gene controle foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme proposto por (Livak e Schmittgen, 2001). Os ensaios foram realizados em triplicata com duas réplicas biológicas (experimentos independentes).

3.11. Análises comparativas de sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos

As sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos dos genes de *X. fastidiosa* selecionados para análises comparativas foram recuperadas de bases de dados tais como GenBank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), *Xylella fastidiosa* Genome Project (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>), *Xylella fastidiosa*/Pierce's Disease Strain Genome Project (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/lbi/index.html>) e *The Integrated Microbial Genomes* (IMG) (Markowitz *et al.*, 2012). A recuperação das sequências de interesse foi realizada através de buscas por similaridade utilizando-se os programas BLASTn e BLASTp disponíveis nestes servidores (Altschul *et al.*, 1997). Alternativamente as bases de dados foram interrogadas com palavras-chave relativas a nomes de produtos gênicos associados ao metabolismo de ferro.

O alinhamento de sequências de aminoácidos ou de nucleotídeos foi realizado com o programa ClustalW2 (Thompson *et al.*, 2002).

---

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise comparativa de genes associados ao metabolismo de ferro em cepas de *X. fastidiosa*

A anotação original do genoma de *X. fastidiosa* cepa 9a5c identificou mais de 60 genes potencialmente associados com o metabolismo de ferro (Simpson *et al.*, 2000b), os quais codificariam proteínas relacionadas à captação, armazenagem, utilização e regulação do metabolismo de ferro; em sua maioria, proteínas que utilizam ferro como cofator ou grupo prostético. Entretanto, genes de biossíntese de sideróforos, os quelantes de íon férrico produzido por bactérias, não foram identificados. Além desses, também não foram identificados ortólogos dos genes *fes* e *fhuF*, que codificam, respectivamente, uma esterase responsável pela degradação de sideróforos do tipo catecolato e uma redutase capaz de remover o ferro de sideróforos do tipo hidroxamatos (Andrews *et al.*, 2003a). O genoma de *X. fastidiosa* 9a5c também não codifica ortólogos da proteína periplasmática FecB e do sistema de dois componentes FecIR, relacionados a captação de dicitrato férrico. Também não foram identificados ortólogos de TbpA e TbpB, que são componentes do receptor de transferrina, uma proteína quelante de ferro extracelular de hospedeiros animais.

Com o intuito de verificar se outras cepas de *X. fastidiosa* dispõem de um arsenal de genes relacionados a homeostase de ferro semelhante ao existente na cepa 9a5c, realizamos uma análise comparativa de conjunto selecionado de genes em seus respectivos genomas. A Tabela 2 lista os genes comparados, as 14 cepas de *X. fastidiosa* cujos genomas estão sequenciados e as similaridades observadas. Vale destacar que nesta análise foram incluídos os genomas de 6 cepas recentemente sequenciados em nosso grupo de pesquisa (Pierry, 2012; Santana, 2012), os quais ainda não estão publicamente disponíveis.

As análises dos genes selecionados (Tabela 2) mostraram pouca ou nenhuma variação relevante entre os genomas das cepas comparadas. A conservação observada já era esperada, já que todas essas cepas se desenvolvem no mesmo ambiente, o xilema de seus hospedeiros vegetais. Esse ambiente não deve variar entre os diferentes hospedeiros vegetais em relação à forma como o ferro está disponível para a bactéria infectante, assim como em relação a variações na concentração de ferro. Os mecanismos de armazenamento, utilização e principalmente de captação de ferro parecem ser também bem conservados entre as diferentes cepas de *X. fastidiosa*.

Tabela 2. Análise comparativa de CDS relacionadas ao metabolismo de ferro em diferentes cepas de *X. fastidiosa*

		Cepas	9a5c	U24d	Fb7	J1a12	3124	Pr8x	Hib4	M12	Dixon	Ann1	EB92-1	GB514	M23	Tem
CDS (9a5c)	Produto predito	# aa														
Captação de ferro																
XF0324	periplasmic iron binding protein	346														
XF0384	outer membrane hemin receptor (TBDR)	681														
XF0599	TonB-dependent receptor (TBDR)	759														
XF0932	ferrous iron transport protein A/FeoA	78														
XF0933	ferrous iron transport protein B/FeoB	617														
XF0934	ferrous iron transport protein C/FeoC	83														
XF1496	TonB-dependent receptor (TBDR)	683														
XF2134	ferric enterobactin receptor (TBDR)	793														
XF2137	ferric enterobactin receptor (TBDR)	788														
XF2713	TonB-dependent receptor (TBDR)	868														
Utilização de ferro																
XF0566	ferrochelataze	337														
XF0771	acyl carrier protein	89														
XF1038	peptide synthase/ Acyl-coenzyme A synthetase	503														
XF1359	heme oxygenase	387														
XF1512	protoporphyrinogen oxidase	275														
XF1726	dehydrogenase with different specificities	255														
XF2094	multi-drug efflux transporter	1055														
XF2135	dithiol-disulfide isomerase involved in polyketide biosynthesis	223														
XF2232	catalase/peroxidase	743														
XF2276	peptide synthase/ Acyl-coenzyme A synthetase	547														
Armazenamento de ferro																
XF0395	bacterioferritin	154														
XF0961	bacterioferritin comigratory protein/ Peroxiredoxin	159														
XF1382	DNA-binding ferritin-like protein (Dps protein)	180														
Reguladores de expressão gênica dependentes de metal																
XF1013	Mn-dependent transcriptional regulator (DtxR family)	160														
XF2344	transcriptional regulator Fur	146														

As similaridades das sequências de aminoácidos de CDS ortólogas identificadas no genoma das cepas indicadas relativamente à cepa 9a5c estão representadas em cores: verde >98%, salmão 95-98% e rosa claro 90-94%. Ausência completa da CDS está indicada em preto. CDS truncadas estão representadas em vermelho. As alterações de sequência nestas CDS podem refletir eventuais erros de sequenciamento. O número de aminoácidos do produto predito para CDS indicada (# aa) está baseado na anotação atualizada do genoma da cepa 9a5c.

Como mencionado anteriormente, a captação do ferro disponível no ambiente é requerimento essencial para homeostase celular. Diversos mecanismos para captação do ferro disponível já foram descritos em bactérias, sendo que de modo geral as bactérias obtêm ferro do meio em forma complexada, com sideróforos, grupos heme ou proteínas, ou em forma livre, em que o átomo de ferro é internalizado sem que esteja associado a outras moléculas. Em uma mesma bactéria, a presença de diversos sistemas de captação de ferro reflete as diversas formas em que o ferro está disponível para a bactéria ao longo do seu ciclo de vida (Braun e Hantke, 2011). A composição relativamente simples de sistemas envolvidos no metabolismo de ferro em *X. fastidiosa* reflete o genoma reduzido dessa bactéria, adaptado às restritas condições nutricionais do fluido xilemático a partir do qual obtém nutrientes.

O genoma de *X. fastidiosa* codifica receptores dependentes de TonB (XF0339, XF0384, XF0599, XF1496, XF2134, XF2137, XF2713), os quais, em outras bactérias gram-negativas, são associados à internalização de átomos de ferro complexado (Meidanis *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2010; Cornelis, 2010). Além dos genes associados à captação de ferro complexado, *X. fastidiosa* também possui genes que codificam componentes do sistema de transporte FeoABC, que está envolvido na captação de átomos de ferro reduzido (Fe^{2+}) livre em outros organismos (Andrews *et al.*, 2003a). Assim, ao contrário de outras bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas spp.* e *Escherichia coli*, *X. fastidiosa* apresenta, entre os sistemas já descritos, apenas esses dois sistemas de captação de ferro, o que, mais uma vez, reforça o estilo de vida restrito da bactéria. A Figura 4 destaca os principais sistemas bacterianos de captação de ferro já descritos, indicando os componentes do metabolismo de ferro potencialmente funcionais em *X. fastidiosa*.

É interessante notar que *X. fastidiosa* vive em um ambiente oxigenado em que o ferro deve estar na forma oxidada altamente insolúvel, sendo necessário que esteja complexado para transporte. Nossa hipótese é que esta bactéria deve se utilizar predominantemente dos receptores dependentes do sistema de energização TonB-ExbB-ExbD para captação de ferro. Como já mencionado, esses receptores são responsáveis pela captação de ferro complexado a sideróforos, grupos heme, citrato e proteínas do hospedeiro, tais como lactoferrina e transferrina (Noinaj *et al.*, 2010; Krewulak e Vogel, 2011). Como em outras bactérias, o sistema de transporte FeoABC, localizado na membrana interna e funcional para captação de íon ferroso, não deve ter um papel relevante para captação de ferro extracelular em *X. fastidiosa*.

Figura 4. Principais sistemas de homeostase de ferro encontrados em bactéria. Os sistemas apresentam em vermelho não estão anotados no genoma de *Xylella fastidiosa*. Adaptado de (Zaini, 2007b).

4.2. Avaliação da captação de ferro em *X. fastidiosa*

A estratégia majoritariamente empregada por bactérias para captação de ferro é a utilização de sideróforos, pequenas biomoléculas que apresentam alta afinidade por íon férrico. Os sideróforos são sintetizados no citoplasma, exportados para o meio extracelular e internalizados uma vez que estejam complexados com ferro. A maioria das bactérias já estudadas produz pelo menos um tipo de sideróforo, sendo que a estrutura de mais de 200 sideróforos já é conhecida (Hider e Kong, 2010). *X. fastidiosa* também parece produzir um composto quelante de ferro que poderia corresponder a um sideróforo (Silva-Stenico *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2006; Simionato *et al.*, 2010). Além disso, o genoma dessa bactéria codifica vários transportadores de sideróforos dependentes de TonB (Meidanis *et al.*, 2002) (Tabela 2).

Nós confirmamos, através do ensaio com o reagente *chrome azurol sulfonate* (CAS) (Schwyn e Neilands, 1987), que *X. fastidiosa* produz sideróforos. O reagente CAS, quando ligado a ferro, tem cor azul. A produção e secreção de sideróforos no meio fazem com esse composto perca o ferro associado, e mude de cor, ficando alaranjado/amarelado. Sendo assim, a observação de mudança de cor em torno de colônias crescidas em meio que

contém esse reagente é indicativa da produção de sideróforos pela bactéria. Como mostrado na Figura 5, observamos a formação de um halo de descoloração em torno das colônias de *X. fastidiosa*, cepa 9a5c, após três dias de crescimento em meio PWG, sendo que o halo se torna bem evidente após sete dias de cultivo. O halo de descoloração também foi observado em células transferidas para meio PWG contendo quelante de ferro 2,2'-dipiridil (PWG-CAS-DP). Nossa expectativa era que a carência de ferro induziria maior captação de ferro, gerando portanto maior halo. Porém não foi o que observamos, possivelmente por se tratar de uma metodologia apenas qualitativa.

Realizamos outros ensaios variando as condições de cultivo e pré-tratamento, tais como pré-incubação de *X. fastidiosa* cepa 9a5c por 4 h em meio PWG com 100 μ M de pirofosfato férrico. Em todos os ensaios, observamos halo de descoloração semelhante ao mostrado na Figura 5 (dados não mostrados). Também foram realizados experimentos para avaliar a resposta da cepa Temecula quando crescida em meio com reagente CAS, sendo que as culturas celulares reagiram positivamente com o composto (dado não mostrado).

Figura 5. Análise de produção de sideróforo pelo método universal de detecção desse tipo de composto utilizando o reagente *chrome azurol sulfonate* (CAS). A figura mostra detalhe de placas contendo meio PWG com o reagente CAS e a adição ou não do quelante de ferro 2,2'-dipiridil (PWG-CAS e PWG-CAS-DP, respectivamente). A presença de um halo em torno das colônias bacterianas é indicativo de reação do sideróforo produzido pela bactéria com o reagente CAS. O controle negativo é feito em placas sem inoculação de bactérias.

Nossos resultados confirmam evidências da literatura (Silva-Stenico *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2006; Simionato *et al.*, 2010) de que *X. fastidiosa* produz compostos do tipo sideróforo, e que essa produção parece ser constitutiva, uma vez que a bactéria continuou

produzindo o composto mesmo em condições em que não há carência de ferro. Caso essa expressão constitua seja de fato provada, a utilização de sideróforo por *X. fastidiosa* deve ser a principal forma de captação de ferro, ocorrendo continuamente mesmo em meio com alta quantidade de ferro, como é o meio PWG. Cabe também mencionar que o meio PWG tem ferro na forma hêmica, cloreto de hemina, que poderia ser internalizado diretamente por um receptor de membrana externa dependente de TonB especializado em captação de ferro hêmico, putativamente codificado pela CDS XF0384.

Realizamos uma tentativa de separação e caracterização química do eventual sideróforo produzido em meio PIM-6. Sobrenadantes de culturas de células crescidas por cinco dias em meio PIM-6 contendo tratamentos de carência e excesso de ferro foram extraídos com metanol 80% e 100% antes de serem analisados por espectrometria de massas. Entretanto, essa abordagem não foi bem sucedida, já que não foi possível identificar picos relativos a qualquer composto com características estruturais de sideróforo. Isso pode ter ocorrido por conta da pequena quantidade de sobrenadante utilizada para extração com o solvente orgânico, ou ainda devido ao próprio método de extração. Experimentos que se utilizem de outras abordagens devem ser testados para separação e caracterização do sideróforo putativamente produzido por *X. fastidiosa*.

Consideramos também que *X. fastidiosa* possa utilizar ferro oferecido na forma de citrato férrico, uma vez esta é a forma em que, aparentemente, o ferro ocorre no xilema (Durrett *et al.*, 2007; Kim e Guerinot, 2007; Palmer e Guerinot, 2009; Yokosho *et al.*, 2009; Rellan-Alvarez *et al.*, 2010). O citrato é um ácido orgânico com constante de afinidade por ferro suficientemente alta para permitir a complexação e transporte desse metal. Para acessar a capacidade de *X. fastidiosa* utilizar citrato férrico, provavelmente a fonte nutricional de ferro para a bactéria *in planta*, realizamos ensaios para avaliar sua capacidade de captura de ferro oferecido dessa forma. Para isso, células crescidas por 7 dias em meio PWG sem fonte de ferro (meio LI) receberam ~45 μM de citrato férrico. Após 30min e 15h, as células foram coletadas e a concentração total de ferro associado à massa celular foi dosada por ICP-AES. Observamos que após 15 h de exposição ao citrato férrico (Tabela 3), a quantidade de ferro associado às células mais que duplicou em relação a 30 min de incubação com esse composto. No tratamento controle, em que foi adicionado citrato de sódio, ferro não foi detectado. Estes resultados sugerem que *X. fastidiosa* consegue capturar o ferro oferecido na forma de citrato férrico.

Tabela 3. Avaliação da quantidade de ferro associada à massa celular de *X. fastidiosa* exposta a citrato férrico.

Tempo / h	[Fe](ppm/OD _{600nm})	
	FeCit	NaCit
0	n.d.	n.d.
0,5	0,0476±0,0219	n.d.
15	0,1567±0,0061	n.d.

Células crescidas por 7 dias em meio PWG sem fonte de ferro receberam ~45 µM de citrato férrico (FeCit) ou ou citrato de sódio (NaCit). Após 30min e 15h, as células foram coletadas e a concentração total de ferro associado à massa celular foi dosada por ICP-AES. A concentração de ferro está normalizada pela densidade ótica das culturas medida pela absorbância a 600 nm. Valores apresentados como média±desvio padrão de duas réplicas biológicas.

É interessante que não há anotado no genoma de *X. fastidiosa* genes relacionados ao sistema de transporte específico para citrato férrico (FecA, FecIR), como ocorre em *Escherichia coli* e em espécies dos gêneros *Pseudomonas*, *Bordetella* e *Xanthomonas*, entre outras (Braun *et al.*, 2003). Além disso, Marshall e colaboradores (Marshall *et al.*, 2009) observaram que linhagens não-produtoras de sideróforos de *Pseudomonas aeruginosa* com sistema de transporte de citrato férrico interrompido por mutação no gene que codifica para o transportador de membrana externa (*fecA*) não conseguem internalizar citrato férrico. O mesmo foi observado em *Escherichia coli* por Mahren e colaboradores (Mahren *et al.*, 2005). Além disso, a constante de afinidade por ferro do composto citrato férrico é bem mais baixa que a observada para sideróforos já caracterizados (Jones *et al.*, 2007), o que tornaria viável a utilização de sideróforos para captar o ferro que está sendo transportado no xilema na forma de citrato férrico.

Observamos também que citrato férrico pode ser utilizado como fonte de ferro ao longo do crescimento prolongado de *X. fastidiosa*, visto que o perfil da curva de crescimento não é significativamente afetado no cultivo com essa fonte de ferro (Figura 5). Os resultados mostrados nesta figura evidenciam que o ferro é requerimento essencial para o crescimento de *X. fastidiosa*, uma vez que nenhum crescimento foi observado na presença do quelante de ferro 2,2 dipiridil (meio NI).

Ainda que a produção de sideróforos seja a estratégia mais provável para captura de ferro, experimentos adicionais são necessários para compreender em maior detalhe este mecanismo em *X. fastidiosa*.

Figura 6. Crescimento celular de *Xylella fastidiosa* medido pela absorbância a 600 nm ao longo de 14 dias em meios com diferentes fontes de ferro. PWG: meio padrão para crescimento de *X. fastidiosa*; NI: Meio PWG com adição de quelante de ferro 2,2'-dipiridil para concentração final de 200 μ M; PWG + CitFer: Meio PWG sem hemina com adição de citrato férrico para concentração final de 28 μ M. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata técnica. Os dados são referentes a uma réplica biológica representativa de outras três.

4.3. Busca por genes potencialmente associados à síntese de sideróforo em *X. fastidiosa*

Genes envolvidos diretamente no metabolismo de ferro, em geral, são regulados de acordo com a concentração de ferro do meio, estando entre esses os genes envolvidos na síntese de sideróforos (Andrews *et al.*, 2003b; Dobson *et al.*, 2006; Sonti e Pandey, 2010). A partir desta premissa, nós definimos uma lista de genes de *X. fastidiosa* possivelmente envolvidos no metabolismo de sideróforos (Tabela 4) para investigarmos seus perfis de expressão em resposta a carência de ferro no meio. Estes genes foram identificados através de análises de similaridade por BLAST e por buscas nos genomas anotados. As buscas basearam-se tanto em homologia de genes como em buscas de domínios usualmente encontrados em genes associados à síntese e utilização de sideróforos em outras bactérias.

Tabela 4. CDS potencialmente associadas à síntese e exportação de sideróforos em *X. fastidiosa*.

CDS (cepa 9a5c)	Produto Preditado
XF0772	hypothetical protein
XF0775	hypothetical protein
XF1038	peptide synthase
XF1726	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase
XF2094	multi-drug efflux transporter
XF2134	ferric enterobactin receptor (TBDR)
XF2135	polyketide synthase (DSBA oxidoreductase)
XF2255	acetyl-coenzyme A synthetase
XF2276	peptide synthase
XF2347	hypothetical protein

As CDS XF0772 e XF0775 se encontram em um cluster gênico que contem genes cujos produtos estão anotados originalmente como proteínas hipotéticas. Entretanto esses genes apresentam similaridade com o locus *pig* de *Xanthomonas* (*e-value* de 8e-69 para XF0772 em relação à proteína de membrana para biossíntese de xanthomonadina; *e-value* de 5e-133 para XF0775 em relação à aciltransferase para biossíntese de xanthomonadina), envolvido na síntese de xanthomonadina, pigmento sintetizado pelos membros do gênero *Xanthomonas*. *X. fastidiosa* apresenta grande parte das enzimas desse cluster de *Xanthomonas*, exceto por uma halogenase responsável pelos átomos de bromo encontrados no pigmento em *Xanthomonas*. A literatura indica que *X. fastidiosa* não produz xanthomonadina (Moreira *et al.*, 2005), apesar de não termos encontrado nenhum dado mais preciso mostrando a ausência de xanthomonadina ou pigmento semelhante em *X. fastidiosa*. A xanthomonadina é um aril-polieno bromado (poliquetídeo) sintetizado por um complexo proteico que pode ser categorizado como poliquetídeo sintase do tipo II (Goel *et al.*, 2002). Poliquetídeos são metabólitos secundários que podem atuar como antibióticos, pigmentos e sideróforos, entre outros.

As CDS XF1038, XF1726, XF2255, XF2276 e XF2347 codificam para proteínas que apresentam domínios essenciais para a síntese de sideróforos em vários microrganismos (Crosa e Walsh, 2002a), como peptídeo sintases não-ribossomais e desidrogenases. A CDS XF2135 foi originalmente anotada simplesmente como poliquetídeo sintase. Verificamos que esta CDS tem similaridade com tiol-oxidoreduases envolvidas na síntese de poliquetídeos. Metabólitos desse tipo podem ter atividade de sideróforo em alguns organismos (Drechsel e Jung, 1998; Piel, 2010).

A CDS XF2134 é similar ao receptor de sideróforo FepA de *E. coli* (*e-value* de 1e-20). A CDS XF2094, anotada como uma proteína de resistência a drogas, apresentada alta

similaridade ($e\text{-value} = 0$) a MexB de *Pseudomonas aeruginosa*, proteína codificada pelo operon mexA-mexB-oprK, o qual está envolvido na exportação de pioverdina, um dos sideróforos sintetizados por esse organismo (Li *et al.*, 1995).

O nível dos transcritos destas CDS foi avaliado, por RT-qPCR, nas células de *X. fastidiosa*, cepa 9a5c, expostas por 30 minutos a 200 μM de 2,2'-dipiridil ou 100 μM de pirofosfato férrico para simular, respectivamente, carência e excesso de ferro. A eficiência destes tratamentos foi previamente confirmada pela verificação do aumento dos níveis de transcritos de XF0933, que tem sua expressão fortemente estimulada na carência de ferro (Zaini *et al.*, 2008b). Não observamos variação reproduzível no nível dos transcritos de XF0772, XF0775, XF2094, XF2255 e XF2347 em três experimentos independentes que foram realizados (dados não mostrados), de forma que essas CDS foram descartadas do grupo de genes potencialmente envolvidos no metabolismo de sideróforos em *X. fastidiosa*. Os resultados dos ensaios de RT-qPCR obtidos para XF1038, XF1726, XF2134, XF2135 e XF2276 estão apresentados na figura 6. Vale destacar, que em estudos em nosso grupo utilizando microarranjos de DNA (Zaini *et al.*, 2008b), a expressão das 10 CDS listadas na Tabela 4 ou não foi detectada ou não se verificou modulação relevante nas situações de carência ou excesso de ferro.

Figura 7. Análise da expressão de genes putativamente envolvidos na via de utilização de sideróforos em *X. fastidiosa*. Culturas de *X. fastidiosa* crescidas por 7 dias foram tratadas por 30 minutos com 200 μM de 2,2'-dipiridil ou 100 μM de pirofosfato férrico. A expressão dos genes foi estimada em relação a uma cultura que não recebeu tratamento algum. Os dados mostrados são referentes a uma réplica biológica representativa de um total de três réplicas. As barras de erro se referem ao desvio padrão obtido entre os Cts de cada triplicata técnica.

As XF1038 e XF2276 são as duas únicas peptídeo-sintases não-ribossomais anotadas no genoma da cepa 9a5c de *X. fastidiosa*. Essas enzimas são essenciais na síntese de grande parte dos sideróforos bacterianos, sendo as responsáveis pela “montagem” desses compostos (Crosa e Walsh, 2002a; Barry e Challis, 2009). Há ainda outra via de síntese de sideróforos em bactérias, independente de peptídeos sintases (Challis, 2005; Barry e Challis, 2009), mas não há no genoma de *X. fastidiosa* genes homólogos para genes envolvidos nessa via. A CDS XF1038 não teve sua expressão regulada pela concentração de ferro no meio, o que nos faz descartar essa CDS dentre as possivelmente envolvidas na via de síntese de sideróforo que *X. fastidiosa* putativamente apresenta. Entretanto a CDS XF2276 apresenta-se com nível de expressão ligeiramente aumentado em situação de carência de ferro (Figura 6). Esse resultado nos leva a supor que, se *X. fastidiosa* sintetiza sideróforos para captação de ferro, a peptídeo sintase responsável pela montagem desse sideróforo poderia ser a codificada pela CDS XF2276.

Entre os genes que analisamos, a CDS XF1726 também apresentou resultado bastante promissor, com maior nível de transcritos em resposta à carência de ferro (Figura 6). O produto predito desta CDS é *short-chain dehydrogenase/reductase* que tem 44% de similaridade com a proteína EntA, de *Escherichia coli*. O gene *entA*, além de ter sua expressão induzida por carência de ferro, é essencial para a síntese de enterobactina, um dos sideróforos produzidos por *E. coli* (Liu *et al.*, 1989; Khalil e Pawelek, 2011). Sendo assim, a CDS XF1726 apresenta-se também como uma boa candidata para estudos posteriores visando entender qual seu papel no metabolismo de *X. fastidiosa*, principalmente no que tange à síntese de sideróforos, considerando sua semelhança com a proteína de *E. coli*. É importante frisar que a CDS XF1726 encontra-se em uma região de genes de bacteriófago, a qual não é encontrada na cepa Temecula (Varani *et al.*, 2008). Como foi visto anteriormente, a cepa Temecula é proficiente na síntese de composto do tipo sideróforo pelo método do reagente CAS. Dessa forma, a CDS XF1726 deve ter sua importância relativizada no que diz respeito à síntese de sideróforos em *X. fastidiosa*. Pode ser que essa CDS não seja essencial para a síntese de composto do tipo sideróforo nesse organismo, ou talvez seja relevante apenas para as cepas sul-americanas. Caso isso se prove, a cepa Temecula necessitaria de uma enzima que suprisse a função da CDS XF1726, ou ainda, poderia apresentar uma via de síntese de sideróforo alternativa.

O nível de transcritos de XF2134 (ortólogo do receptor de sideróforo FepA de *E. coli*) foi moderadamente aumentado em resposta à carência de ferro (Figura 6). Esses receptores são dependentes do complexo de energização Tonb-ExbB-ExbDe e têm função majoritariamente associada à captação de sideróforos (Krewulak e Vogel, 2011). Esta CDS apresentou uma regulação típica para genes com essas funções, mas a baixa expressão relativa nos impede de inferir uma importância desse gene na homeostase de ferro em *X.*

fastidiosa.

A CDS XF2135 (DSBA oxidoreductase) apresentou, ao contrário do esperado, aumento da expressão na condição de excesso de ferro (Figura 6). Este resultado nos faz descartar essa CDS como uma possível candidata para o processo de síntese de sideróforo em *X. fastidiosa*.

Assim, as CDS XF2276 e XF1726 despontam como fortes candidatas a estarem envolvidas na síntese de sideróforo em *X. fastidiosa*. Análises preliminares não encontraram Fur box nos promotores desses genes, apesar de esse tipo de regulação não poder ser descartado. Essas CDS certamente são alvos interessantes na busca da via de síntese do composto do tipo sideróforo que *X. fastidiosa* deve sintetizar para captação de ferro. Ainda, é interessante notar que nos organismos já estudados em relação à biossíntese de sideróforos, os genes de síntese, importação e exportação de sideróforo estão organizados em operons e/ou clusters (Crosa e Walsh, 2002b; Franza *et al.*, 2005; Pandey e Sonti, 2010). Em *X. fastidiosa* não há qualquer operon ou *cluster* gênico que contenha os genes envolvidos nesse aspecto do metabolismo de ferro. Apesar dessa bactéria possuir genes que em outros organismos estão envolvidos na síntese de sideróforos, como peptídeo sintases, oxiredutases, desidrogenases e receptores específicos, eles estão dispersos no genoma. A comprovação da produção de um sideróforo por *X. fastidiosa* seria interessante por mostrar que a bactéria consegue reunir produtos gênicos codificados a partir de regiões distintas no genoma e que juntos são eficientes na síntese de sideróforo.

4.4. Crescimento e formação de biofilme de *Xylella fastidiosa* crescida em carência e excesso de ferro

Visando investigar em maior detalhe a resposta de *X. fastidiosa* a diferentes concentrações de ferro no meio, analisamos o perfil de crescimento e formação de biofilme em meios de cultura com diferentes disponibilidades de ferro.

Inicialmente avaliamos duas condições de crescimento em carência de ferro: (1) meio PWG sem adição de qualquer fonte de ferro, ou seja, o ferro disponível para crescimento das células era o ferro traço contido nesse meio complexo (meio LI) e (2) meio PWG padrão com adição de 200 μ M de 2,2'-dipiridil, um forte quelante de ferro (meio NI). Nessa concentração, esse composto quela todo o ferro disponível no meio (Zaini *et al.*, 2008b). As células foram crescidas por até 14 dias, sendo avaliadas em relação à multiplicação celular, por leituras de densidade ótica a 600 nm, e à formação de biofilme, pelo método do Cristal Violeta (figura 8).

Figura 8. Crescimento e formação de biofilme por *X. fastidiosa* crescidas em condições de carência de ferro. (A) Crescimento celular medido por densidade ótica a 600 nm ao longo de 14 dias. (B) Formação de biofilme medida pelo método do Cristal Violeta, com medida de absorbância a 595 nm, ao longo de 14 dias. O meio LI (do inglês *low iron*) se refere ao meio PWG (controle) sem adição da fonte de ferro cloreto de hemina, enquanto o meio NI (do inglês *no iron*) se refere ao meio PWG com adição de 200 μ M de 2,2'-dipiridil, um forte quelante de ferro. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata técnica. Gráficos referentes a uma réplica biológica representativa de outras três.

Como pode ser observado na figura 8(A), as culturas de *X. fastidiosa* crescidas no meio LI apresentaram um perfil de crescimento muito semelhante ao observado para as células crescidas no meio CT (controle). Esse crescimento semelhante entre duas culturas que diferem unicamente pela presença da fonte de ferro no meio PWG (cloreto de hemina)

pode ser justificado tanto pela captação eficiente do ferro traço presente no meio LI como pelo ferro proveniente do inóculo usado para iniciar a curva de crescimento. O meio PWG tem concentração de ferro relativamente alta (~ 0,08 ppm), de modo que as células inicialmente crescidas nesse meio podem ter criado reservas intracelulares desse metal. Já as células colocadas no meio NI não apresentaram crescimento algum, ou aumento de formação de biofilme, ao longo do período de tratamento. O meio NI não possui ferro biodisponível para as células, o que justifica a ausência de crescimento observado como uma necessidade intrínseca de *X. fastidiosa* por ferro, para conseguir se multiplicar. Análises de unidades formadoras de colônia (UFC) mostraram que as culturas crescidas no meio NI permaneceram viáveis até o quinto dia de cultura (dado não mostrado), não sendo observado crescimento em placas de meio PWG a partir do sétimo dia de crescimento. Sendo assim, semelhante ao que é observado para a grande maioria das bactérias, confirmamos que ferro é um metal essencial para o crescimento e desenvolvimento do biofilme de *X. fastidiosa*.

Em relação à formação de biofilme, observa-se um aumento na deposição de biofilme nas culturas crescidas no meio LI, quando comparado com o meio PWG. As células presentes no biofilme bacteriano apresentam uma alta vantagem adaptativa, uma vez que o biofilme está associado tanto a uma maior capacidade das células de obter nutrientes do meio como a uma maior eficiência de detoxificação do microambiente (Nishino *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008a; Caserta *et al.*, 2010b). A baixa concentração de ferro no meio PWG sem hemina, quando comparada com o meio PWG padrão, pode ser o estímulo necessário para que as células produzam mais biofilme e, assim, consigam lidar melhor com a condição nutricional do meio.

Dados da literatura já haviam mostrado que, quando crescida em meio complexo não-definido, *X. fastidiosa* não necessita de uma fonte de ferro para suportar seu crescimento, ou seja, a bactéria é proficiente na captação do ferro traço contido no meio (Chang e Donaldson, 1993). Nossos resultados reforçam esta observação, visto que a bactéria consegue crescer bem em meio PWG sem hemina (meio LI). Já foi observado em trabalhos anteriores que meios muito pobres que não recebiam fonte de ferro, ou meios definidos também sem fonte de ferro, não suportam o crescimento dessa bactéria. Além disso, a adição de fonte de ferro ao meio complexo aumenta a taxa de crescimento da bactéria (Chang e Donaldson, 1993; Almeida *et al.*, 2004).

Os meios NI e LI, com as respostas observadas para crescimento e formação de biofilme, não se mostraram como condição experimental interessante para avaliar a resposta de *X. fastidiosa* à carência de ferro, haja visto que o primeiro não suporta o crescimento da bactéria e o segundo não apresenta uma limitação real para as culturas celulares. Posto isso, propusemos um terceiro meio carente em ferro. Esse meio é baseado

no meio PWG padrão sem adição de fonte de ferro, com adição de 100 μ M de 2,2'-dipiridil, metade da concentração utilizada no meio NI. Esse meio foi denominado VLI, do inglês Very Low Iron (muito pouco ferro). Paralelamente, analisamos o crescimento de *X. fastidiosa* em meio com alta concentração de ferro, o qual era de meio PWG padrão com adição de 100 μ M de pirofosfato férrico, denominado meio HI, do inglês High Iron (alto ferro), elevando em 100x a concentração de ferro (~ 8 ppm). Embora com uma concentração de ferro bastante elevada, o meio HI permite bom desenvolvimento das culturas bacterianas (Zaini *et al.*, 2008b; Fogaca *et al.*, 2010). A figura 9 mostra o perfil de crescimento, formação de biofilme e acúmulo de proteína total por *X. fastidiosa* ao longo de 20 dias de crescimento nos meios CT, VLI e HI. O baixo crescimento observado para as células de *X. fastidiosa* crescidas no meio VLI, uma condição de forte carência de ferro, reforça a importância desse nutriente para o crescimento e desenvolvimento dessa bactéria. A forte inibição de crescimento no meio com pouco ferro biodisponível é observada tanto na fase planquitônica (figura 9A) como na fase séssil, visto pela baixa formação de biofilme nessas culturas (figura 9B). Os dados de acúmulo de proteína total (Figura 9C) reforçam os dados de crescimento planquitônico. Pode-se observar que, apesar de as culturas de *X. fastidiosa* crescerem menos e formarem menos biofilme, elas se adaptaram à condição ambiental, pois mantiveram o comportamento tipicamente observado em culturas bacterianas: inicialmente as células passam por uma fase *lag*, de baixo crescimento (0 a 3 dias, aproximadamente), depois entram em fase estacionária, na qual há um aumento na taxa de crescimento (0 a 7 dias, aproximadamente), e depois começam a entrar em fase estacionária, na qual as células reduzem a taxa de crescimento e tendem a assumir uma forma mais séssil (7 dias em diante). Os dados de formação de biofilme (fase séssil) corroboram a entrada em fase estacionária. O meio VLI apresentou-se como condição ótima para estudos fisiológicos/moleculares da carência de ferro em *X. fastidiosa*, uma vez que ele gera uma situação de carência de ferro, mas ainda suporta algum crescimento bacteriano (Figura 9A).

No meio com alta concentração de ferro (HI), observamos que as culturas de *X. fastidiosa* responderam muito bem ao excesso nutricional de ferro, apesar dos possíveis efeitos tóxicos causados pela alta concentração desse metal. O crescimento total, como pode ser observado na figura 9A, não apresenta uma diferença significativa entre o tratamento padrão e o tratamento com alto ferro, ou seja, o crescimento planquitônico das culturas é bem parecido, dado suportado pelos resultados de acúmulo de proteína total (figura 9C). Uma vez que as células de *X. fastidiosa* apresentaram um perfil de crescimento em meio com alto ferro muito próximo, se não igual, ao das crescidas em meio controle, espera-se que essas células estejam contendo o potencial efeito tóxico causado pelo excesso desse metal. O ferro livre em solução pode entrar em reações químicas que finalmente geram espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas tóxicas para

Figura 9. Crescimento e formação de biofilme por *X. fastidiosa* em carência e excesso de ferro. (A) Crescimento celular medido por densidade ótica a 600 nm ao longo de 20 dias. (B) Formação de biofilme medida pelo método do Cristal Violeta, com medida de absorbância a 595 nm, ao longo de 20 dias. (C) Dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford ao longo de 20 dias. O meio VLI (do inglês *very low iron*), situação de carência de ferro, se refere ao meio PWG sem a fonte de ferro cloreto de hemina com adição de 100 μ M do quelante de ferro 2,2'-dipiridil. O meio "PWG+PP", situação de excesso de ferro, se refere ao meio PWG com adição de 100 μ M de pirofosfato férrico. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão de uma triplicata técnica. Gráficos referentes a um réplica biológica representativa de outras três.

biomoléculas (Cabiscol *et al.*, 2000; Touati, 2000). Uma forma eficiente encontrada por bactérias para lidar com o problema de toxicidade de ferro se dá através de um conjunto de proteínas globulares, as ferritinas e as proteínas semelhantes a ferritina, proficientes no armazenamento de ferro. As ferritinas são encontradas em todos os reinos, sendo que em bactérias são encontradas três diferentes proteínas: proteínas Dps, proteínas ligantes inespecíficas de DNA; bacterioferritina, encontradas apenas em eubactérias; ferritina, encontrada em procariotos e eucariotos. Apesar de essas proteínas formarem famílias evolutivas distintas, elas mantiveram muitas características estruturais e funcionais (Andrews, 2003; Smith, 2004).

No genoma de *X. fastidiosa*, cepa 9a5c, encontramos uma CDS que codifica para uma proteína Dps (XF1324), além de uma para bacterioferritina (XF0395). Essas proteínas podem estar desempenhando algum papel relevante no armazenamento de ferro nas condições estudadas, de forma que será interessante verificar o papel das mesmas dentro da homeostase de ferro nessa bactéria, suas relações com o armazenamento de ferro e proteção contra estresse oxidativo, como já foi observado para algumas bactérias (Smith, 2004; Boughammoura *et al.*, 2012; Reddy *et al.*, 2012). Entretanto, como *X. fastidiosa* não deve experimentar excesso de ferro ao longo do seu ciclo de vida *in planta*, no contexto apresentado, a importância dessas proteínas semelhantes à ferritina para a adaptação e virulência da bactéria não podem ser discutidas. Em um estudo com mutantes de *Dickeya dadantii* para bacterioferritina e ferritina foi apontada a relevância da bacterioferritina para a virulência dessa bactéria, apesar de não ser observado para o mutante fenótipos de suscetibilidade em relação a deficiência de ferro ou estresse oxidativo (Boughammoura *et al.*, 2008). Não há estudos sobre a relevância das proteínas semelhantes à ferritina encontradas em *X. fastidiosa* para a homeostase de ferro e para o processo de adaptação e virulência dessa bactéria *in planta*.

Para verificar a repetibilidade dos resultados de crescimento em baixo ferro e estímulo à formação de biofilme em alto ferro, foram realizadas culturas de *X. fastidiosa* por cinco e sete dias no meio mínimo PIM-6 com adição de quelante de ferro 2,2-dipiridil e de pirofosfato férrico nas mesmas concentrações dos meios VLI e HI, respectivamente. As culturas foram avaliadas em relação à multiplicação celular por quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford e à formação de biofilme pelo método do Cristal Violeta (Bradford, 1976; Zaini *et al.*, 2008b; Fogaca *et al.*, 2010). Os resultados estão apresentados na figura 10.

Como pode ser observado na figura 10, as células crescendo em meio PIM-6 apresentam a mesma resposta observada para culturas em meio PWG padrão quando em condições de carência e excesso de ferro. O resultado reforça a noção de que a resposta apresentada por *X. fastidiosa* deve-se mais à variação da concentração de ferro no meio do

que a fatores específicos do meio.

Em relação à formação de biofilme pelas culturas crescidas nos meio VLI e HI, observa-se que as culturas estudadas em meio com alto ferro, a partir do sétimo dia de crescimento, apresentam acúmulo de biofilme bem maior do que as culturas crescidas em meio padrão. Dependendo da réplica biológica essa diferença se mantém até o vigésimo dia de crescimento, podendo ser equalizada após o 14º dia de tratamento. O que se observa indubitavelmente é que, no intervalo que vai do fim da fase exponencial de crescimento até o completo estabelecimento da fase estacionária, as culturas em alto ferro formam mais biofilme. As células crescidas no meio VLI formaram bem menos biofilme que o controle, mais uma vez reafirmando a necessidade de concentrações suficientes de ferro para o desenvolvimento normal da cultura (Figura 9B).

Figura 10. Crescimento e formação de biofilme por culturas de *X. fastidiosa* crescidas em meio mínimo PIM-6 com diferentes concentrações de ferro. O crescimento celular foi medido através do acúmulo de proteínas totais pelo método de Bradford após 5 e 7 dias de crescimento. A formação de biofilme foi avaliada pelo método do Cristal Violeta, medida em absorbância de 595 nm, também após 5 e 7 dias de crescimento. O meio PIM-6 + DP, que simula carência de ferro, contém quelante de ferro 2,2'-dipiridil com concentração final de 100 µM, enquanto que o meio PIM-6 + PP, que simula alta concentração de ferro, contém pirofosfato férrico, concentração final de 100 µM. Os dados são referentes a média ± desvio padrão de pelo menos duas réplicas biológicas.

A maior formação de biofilme nas células crescidas em meio com alta concentração de ferro foi também investigada quanto à morfologia do biofilme formado e das colônias

Figura 11. Análise em lupa estereoscópica de biofilme de *X. fastidiosa* depositado em lâminas de vidro após crescimento em ausência (meio VLI) e excesso (meio PWG+PP, ou meio HI) de ferro. O meio PWG é o padrão. O biofilme foi observado após quatro dias de crescimento em garrafas de vidro com lâminas de vidro presas. A) Visualização no maior aumento; B) Visualização no menor aumento. As barras de escala correspondem a 0,2 cm nas duas imagens.

componentes. Para isso foram preparadas culturas de *X. fastidiosa* em que as células foram crescidas em garrafas com lâminas de vidro aderidas (Figura 3) contendo os meios HI, VLI e CT. As culturas celulares depositaram seu biofilme em uma linha longitudinal nas lâminas de vidro coladas na garrafa, sendo essa lâmina utilizada para análises em lupa estereoscópica (Figura 11).

O padrão de deposição de mais biofilme nas culturas crescidas em meio com alta concentração de ferro (HI) é facilmente observado pela análise em lupa em menor aumento. No maior aumento, as imagens mostram que não é possível ter definição de colônias nas células crescidas em meio com alto ferro. Esses dados reforçam o forte estímulo da alta concentração de ferro para a deposição de biofilme por *X. fastidiosa*.

O biofilme de culturas crescidas nos meios supracitados também foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), para verificar se os tratamentos empregados e os resultados observados eram perceptíveis em relação à morfologia de células e estrutura do biofilme (Figura 12).

A análise das imagens de microscopia eletrônica (Figura 12) mostra que os tratamentos aos quais as células foram expostas não induziram alterações estruturais no biofilme. As células crescidas em meio VLI parecem apresentar o biofilme um pouco menos estratificado, mas essa diferença é muito sutil para ser discutida. Por outro lado, observamos que o tratamento de alta concentração de ferro fez com as células do biofilme apresentassem estruturas finas e alongadas, semelhantes a pilus do tipo 4 (T4P), ou pilus longo, os quais não foram observadas nos outros tratamentos. T4P são estruturas responsáveis em bactérias por locomoção independente de flagelo, ou movimentação do tipo *twitching* (Wall e Kaiser, 1999; Proft e Baker, 2009). Essa estrutura foi apontada como sendo importante para a formação do biofilme em um grande número de bactérias, inclusive

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme depositado por *Xylella fastidiosa* em lamínulas de borossilicato após crescimento por quatro dias em meio com excesso de ferro (A, meio HI), carência de ferro (B, meio VLI) e em meio PWG padrão (C, meio CT) de ferro. A barra de escala corresponde a 2,5µm nas três imagens.

Erwinia amylovora, um patógeno de plantas (O'Toole e Kolter, 1998; Bechet e Blondeau, 2003; Paranjpye e Strom, 2005; Shime-Hattori *et al.*, 2006; Jurcisek e Bakaletz, 2007; Li *et al.*, 2007; Varga *et al.*, 2008; Koczan *et al.*, 2011). Em um trabalho anteriormente realizado em nosso grupo de pesquisa analisando o perfil de expressão gênica nas mesmas condições de alta concentração de ferro utilizadas nesse trabalho, observou-se que *X. fastidiosa* aumenta a expressão de genes envolvidos na formação de T4P nessa condição (Zaini *et al.*, 2008b). Ainda assim, a alta formação de T4P, um complexo proteico que parece ser relevante para a virulência de *X. fastidiosa* (Meng *et al.*, 2005; De La Fuente *et al.*, 2007), observada em altas concentrações de ferro é um resultado muito intrigante. Que tipo de estratégia embasa a resposta observada por *X. fastidiosa* em concentrações de ferro muito altas, as quais a bactéria provavelmente não encontra ao longo do seu ciclo de vida, e qual a relevância dessa resposta para a bactéria são apontamentos interessantes que devem ser investigados mais a fundo.

Também avaliamos se a adesão entre células (aglutinação celular avaliada como descrito no item 3.8 da sessão Procedimentos Experimentais) seria afetada por variações na concentração de ferro, o que poderia refletir na deposição do biofilme. Infelizmente não foi possível correlacionar maior aglutinação com a exposição a maior concentração de ferro no meio. A exposição de culturas de *X. fastidiosa* a altas concentrações de ferro por um período de pelo menos 12 h não afetou o perfil de aglutinação celular (dados não mostrados). Apesar de não podermos descartar a influência do ferro na adesão entre células de *X. fastidiosa*, esse aspecto do processo de montagem de biofilme em *X. fastidiosa* parece ser menos relevante dentro da resposta observada de aumento de formação de biofilme nas culturas crescidas em alta concentração de ferro.

O reagente cristal violeta, utilizado para quantificação de formação de biofilme, é um ligante inespecífico para uma série de biomoléculas, sendo utilizado para quantificação de biofilme pela sua elevada capacidade de ligação a exopolissacarídeos, principais componentes da matriz extracelular que compõe o biofilme. Dessa forma, a alta deposição de biofilme observada para as células crescidas no meio HI poderia ser devida a um estímulo à produção de exopolissacarídeos no biofilme, mais do que à multiplicação celular no biofilme. Para avaliar a veracidade dessa hipótese, realizamos experimentos de quantificação de açúcares totais associados ao biofilme de células crescidas por 10 dias nos meios HI e VLI. A quantificação de açúcares totais foi realizada pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois, 1968), método já utilizado anteriormente por outros grupos de pesquisa para quantificação de EPS no biofilme de *X. fastidiosa* (Rodrigues *et al.*, 2008b; Cruz *et al.*, 2012). Os resultados obtidos estão apresentados na figura 13.

Como pode ser observado, as células crescidas em meio HI acumularam virtualmente a mesma quantidade de exopolissacarídeos totais na fração do biofilme em

relação às crescidas no meio padrão PWG. Isso descarta a possibilidade que o resultado observado de elevado acúmulo de biofilme em altas concentrações de ferro seja referente à deposição de mais matriz extracelular do que por multiplicação e deposição celular no biofilme.

Estudos anteriores apontam variações na resposta de formação de biofilme influenciadas pela concentração de ferro no meio de crescimento de bactérias. Em culturas de *P. aeruginosa* e *E. coli* o aumento da concentração de ferro diminui a formação de biofilme (Musk *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007; Rowe *et al.*, 2010). Por outro lado, trabalhos com *P. aeruginosa* e *B. cepacia* mostram que culturas crescidas em meio com ferro em excesso às necessidades nutricionais das bactérias aumentam a produção de biofilme através de sinalização para a mudança da fase móvel para a séssil, ou seja, biofilme (Berlutti *et al.*, 2005; Moreau-Marquis *et al.*, 2008).

Figura 13. Acúmulo de açúcares totais associados ao biofilme de *X. fastidiosa* crescida em carência (meio VLI) e excesso (meio PWG+PP) de ferro. Os dados são apresentados como valores relativos ao obtido para quantidade de açúcar depositado no biofilme da bactéria crescida em meio controle (PWG). Dados apresentados como média±desvio padrão de duas réplicas biológicas.

Pseudomonas aeruginosa e *Burkholderia cepacia* são patógenos oportunistas normalmente associados a pacientes com fibrose cística (Govan e Deretic, 1996; Eberl e Tummeler, 2004; Zemanick *et al.*, 2011). Essas bactérias colonizam o muco que se acumula no trato respiratório dos pacientes, um ambiente que apresenta altas concentrações de ferro (Reid e Kirov, 2004; Reid *et al.*, 2007; Moreau-Marquis *et al.*, 2008). Dessa forma, o estímulo à formação de biofilme em altas concentrações de ferro favorece o estabelecimento da infecção por esses patógenos em pacientes com fibrose cística; de fato, evidências apontam

que *P. aeruginosa*, nesse ambiente, existe mais na forma de biofilme do que plaquitonicamente (Reid *et al.*, 2009).

Em *X. fastidiosa* o estímulo à formação de biofilme observado em altas concentrações de ferro não deve ser encontrado pela bactéria *in planta*, uma vez que a bactéria passa toda sua história de vida em ambientes com baixa concentração de nutrientes. Isso deve acontecer mesmo enquanto a bactéria estiver no inseto vetor, já que esse inseto se alimenta exclusivamente de fluído xilemático. A maior formação de biofilme observada pode ser uma estratégia adaptativa encontrada pelas culturas de *X. fastidiosa* para lidar com uma concentração de ferro bem acima de suas necessidades nutricionais, como já visto que o biofilme é eficiente na detoxificação do microambiente (Nishino *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008a; Caserta *et al.*, 2010b). Observa-se nas curvas de crescimento e de formação de biofilme que após o 14º dia de crescimento, as culturas em meio controle e com alto ferro tendem a igualar a quantidade de biofilme depositada. Sendo assim, o ferro em altas concentrações pode estar estimulando antecipadamente a formação de biofilme, a qual ocorre mais acentuadamente em fase estacionária, ou ainda pode estar apenas facilitando a montagem do biofilme, em nível estrutural, haja vista que muitos cátions inorgânicos já foram relacionados a papéis estruturais no biofilme (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Song e Leff, 2006; Cruz *et al.*, 2012). Dessa forma, mais experimentos são necessários para evidenciar qual a base molecular do efeito da alta concentração de ferro no estímulo à formação de biofilme em *X. fastidiosa*, e assim tentar entender melhor a relevância biológica do resultado obtido.

Interessantemente observamos que há um aumento na concentração de exopolissacarídeos totais nas células crescidas no meio VLI (figura 13), apesar de essas células crescerem menos e formarem menos biofilme quando crescidas nesse meio de cultura, como já foi visto (figura 9). A carência de ferro provavelmente gera uma resposta nas células de aumento de deposição de matriz extracelular, ou pelo menos dos exopolissacarídeos (EPS) componentes dessa matriz. Esse tipo de resposta de estímulo à produção de EPS por baixas concentrações de ferro já foi observado em *Aggregatibacter actinomycetecomitans*, *Staphylococcus epidermidis* e *Corynebacterium diphtheriae* (Deighton e Borland, 1993; Moreira *et al.*, 2003; Amarasinghe *et al.*, 2009). Nos parece que essa é a primeira vez que esse tipo de resposta é observada em uma bactéria fitopatogênica.

Os exopolissacarídeos são os principais componentes da matriz extracelular que compõe o biofilme. Juntamente com DNA, proteínas e outras biomoléculas, eles formam a base estrutural na qual as células bacterianas estão localizadas (Frolund *et al.*, 1996; Flemming e Wingender, 2001; Flemming e Wingender, 2010). Os EPS têm ampla gama de funções, como formação de barreira estrutural; retenção de água, compostos orgânicos e íons inorgânicos; fonte de nutriente; e coordenação de proteínas extracelulares. Entretanto,

os EPS estão principalmente envolvidos na adesão e estruturação do biofilme (Flemming e Wingender, 2010; Petrova e Sauer, 2012). Em *P. aeruginosa* e *Caulobacter crescentus*, os EPS são essenciais para a mudança de fase móvel para uma sésil, aderida (Caiazza e O'Toole, 2004; Caiazza *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012), sendo que para várias bactérias os EPS são essenciais para montagem do biofilme (Watnick e Kolter, 1999; Danese *et al.*, 2000; Byrd *et al.*, 2009).

Em bactérias fitopatogênicas, como *Pantoea stewartii*, também se observa que a produção adequada de EPS é importante para adesão e estruturação do biofilme. Para essa bactéria, assim como para *Ralstonia solanacearum*, um fitopatógeno que coloniza o xilema de plantas assim como *X. fastidiosa*, os EPS foram associados tanto ao desenvolvimento de sintomas pelo hospedeiro, como ao aumento da adaptação e colonização pelas bactérias (Morris e Monier, 2003). Mutantes de genes do operon *gum* de *Xanthomonas* spp., o qual é responsável pela síntese do exopolissacarídeo componente do biofilme, apresentaram perda de virulência *in planta* (Denny, 1995; Morris e Monier, 2003; Rigano *et al.*, 2007). É importante frisar que o gênero *Xanthomonas* pertence a família das *Xanthomonadaceae*, juntamente com *X. fastidiosa*. Essas bactérias são muito próximas evolutivamente. Os genes putativamente envolvidos na via de síntese do exopolissacarídeo de *X. fastidiosa* apresentam alta similaridade com os dessa via de síntese em *Xanthomonas*, de forma que os exopolissacarídeos dessas duas bactérias deve ser parecidos estruturalmente (da Silva *et al.*, 2001).

A observação de que *X. fastidiosa* aumenta a concentração de exopolissacarídeos totais no biofilme quando crescida em meio com pouco ferro pode estar simulando uma resposta da bactéria a uma condição encontrada por ela em sua história de vida. O fluido xilemático do qual as células bacterianas obtêm seus nutrientes é meio muito pobre em nutrientes. As células de *X. fastidiosa* podem estimular a síntese de exopolissacarídeos do biofilme quando *in planta*, aumentando sua adaptabilidade ao meio. Os EPS produzidos podem ajudar na adesão e estruturação do biofilme dessa bactéria, e aumento a colonização do hospedeiro, assim como já visto em outras bactérias fitopatogênicas. Ainda, já foi teorizado que os EPS podem ter importante papel na ligação e estabilização de enzimas extracelulares, como as que são usadas por *X. fastidiosa* para degradação da parede celular de tecidos do hospedeiro e espalhamento dentro do mesmo. Dessa forma, uma baixa concentração de ferro no xilema pode ser um gatilho importante para a expressão desse fator de virulência, EPS, pela bactéria no hospederio vegetal, aumentando sua capacidade de adaptação e infecção das plantas.

5. Considerações finais

A grande maioria das bactérias, assim como os outros seres vivos, utilizam o ferro em uma variedade de processos metabólicos centrais e intermediários, colocando esse metal na lista dos nutrientes essenciais para o desenvolvimento da vida (Andrews *et al.*, 2003a; Andrews, 2010; Chu *et al.*, 2010). A relevância desse metal para o ciclo de vida de *X. fastidiosa*, uma bactéria fitopatogênica, havia sido abordada anteriormente em relação ao efeito desse metal na expressão de genes e em relação à utilização de sideróforos por essa bactéria (Zaini *et al.*, 2008b; Simionato *et al.*, 2010). No presente trabalho expandimos o conhecimento sobre o processo de captação de ferro por *X. fastidiosa* assim como avaliamos a influência de diferentes concentrações desse metal no crescimento e formação de biofilme por essa bactéria.

X. fastidiosa coloniza o xilema das plantas em que vive, podendo causar doença em hospedeiros suscetíveis ou apenas viver como uma bactéria endofítica que parece não causar nenhum problema ao hospedeiro (Chatterjee *et al.*, 2008b; Janse e Obradovic, 2010). Já foi apontado que, no xilema de plantas, o principal meio de transporte de ferro se dá através de citrato férrico (Durrett *et al.*, 2007; Kim e Guerinot, 2007; Palmer e Guerinot, 2009; Yokosho *et al.*, 2009; Rellan-Alvarez *et al.*, 2010). Propusemos um experimento em que avaliamos a capacidade de *X. fastidiosa* capturar citrato férrico após a mesma crescer por sete dias em meio em que não havia sido oferecido nenhuma fonte de ferro. Observamos que, de fato, a quantidade de ferro associado à massa celular aumenta ao longo das primeiras 15 h em que o experimento foi realizado. Interessantemente, *X. fastidiosa* não apresenta em seu genoma qualquer sistema de captação de ferro complexado com citrato, como ocorre com grande parte das bactérias. Dessa forma, se citrato férrico é a fonte nutricional de ferro para a bactéria *in natura*, e ela consegue capturar ferro que o mesmo é oferecido complexado a esse ácido orgânico, espera-se que *X. fastidiosa* tenha algum meio de captação do ferro que está sendo oferecido.

Análises do genoma dessa bactéria mostram uma composição relativamente simples em relação a sistemas de captação de ferro. Essa bactéria apresenta receptores dependentes de TonB, relacionados à captação de ferro complexado, e também o sistema FeoABC, responsável pela captação de íon ferroso livre (Andrews *et al.*, 2003a; Noinaj *et al.*, 2010). Como o ferro apresentado à bactéria no xilema, um ambiente oxigenado, está na forma férrica, o mesmo deve ser retirado do citrato férrico e internalizado para o espaço periplasmático através de alguma molécula com alta capacidade de complexação de íon férrico, um sideróforo. Sideróforos são pequenas biomoléculas com altíssima afinidade por ferro sintetizadas por muitas bactérias como estratégia de captação de ferro (Chu *et al.*, 2010). Realizamos experimentos de detecção de produção de sideróforos putativos pelo

método do reagente CAS (*Chrome Azurol Sulfonate*), universalmente utilizado para esse tipo de análise (Schwyn e Neilands, 1987). *X. fastidiosa* reagiu positivamente com o reagente CAS, indicando que essa bactéria provavelmente sintetiza sideróforo(s). A utilização de sideróforos nesse caso seria essencial, visto o contexto genômico e ambiente em que a bactéria obtém o ferro de sua dieta, podendo ser elencados como um importante fator de virulência para essa bactéria caso se comprove a produção desse tipo de composto. Procuramos no genoma de *X. fastidiosa*, cepa 9a5c, por genes potencialmente envolvidos na utilização de sideróforos e avaliamos a expressão relativa desses genes em condições de carência e excesso de ferro.

Dentro dos genes analisados, dois apresentaram padrão de regulação característico para genes envolvidos em captação de ferro, uma vez que tiveram tendência de aumento de expressão em carência de ferro. Esses genes foram os referentes às CDS XF1726, um desidrogenase muito semelhante a EntA, proteína essencial para síntese do sideróforo enterobactina de *E. coli* (Liu *et al.*, 1989; Khalil e Pawelek, 2011), e XF2276, um peptídeo sintase não-ribossomal, classe de enzimas responsáveis pela montagem de sideróforos em bactérias (Crosa e Walsh, 2002b). Esses genes apresentam como alvos interessantes para pesquisas posteriores buscando compreender a relevância dos mesmos para captação de ferro através de sideróforos em *X. fastidiosa*.

Avaliamos também a resposta de crescimento de *X. fastidiosa* a meios com diferentes concentrações de ferro refletindo uma situação de carência e uma de excesso nutricional desse metal. Culturas de *X. fastidiosa* crescidas em meio com pouco ferro cresceram menos e formaram menos biofilme, mostrando a importância desse metal para o metabolismo dessa bactéria. Quando a bactéria foi cultivada em meio em que o ferro foi totalmente quelado por altas concentrações de quelante 2,2'-dipiridil não foi observado crescimento da bactéria, ou mesmo aumento da formação de biofilme acima de um nível basal, mais uma vez reforçando a importância do ferro para desenvolvimento de *X. fastidiosa*. Já culturas de *Xylella* crescidas em meio com alta concentração de ferro cresceram no mesmo nível que as culturas crescidas em meio PWG controle, descartando a possibilidade de que as altas concentrações de ferro impostas poderiam gerar efeitos tóxicos para as células. Interessantemente, observou-se que as culturas em meio com alta concentração de ferro depositaram mais biofilme que as culturas em meio controle no período de 6-14 dias, aproximadamente, sendo que essa diferença era bastante perceptível em 7 dias de crescimento.

Na tentativa de entender melhor essa resposta de maior acúmulo de biofilme nas culturas crescidas em meio com alta concentração de ferro analisamos morfológicamente o biofilme depositado em lâminas de vidro quando essas culturas eram crescidas em meio com alto ferro, além de em meio padrão e com baixa concentração de ferro. As análises

mostram que, após quatro dias de crescimento, o biofilme depositado em lâmina por células crescidas em alta concentração de ferro além de ser maior em quantidade, não apresentava definição de colônias, o biofilme era depositado como um “tapete de células”, ao contrário do observado para as células crescidas em meio padrão ou com baixa concentração de ferro. Dessa forma, ficou reforçada a noção de que a alta concentração de ferro estava estimulando a deposição de mais biofilme por *X. fastidiosa*. O biofilme depositado por culturas de *Xylella* crescida nos meios padrão, com baixo ferro e com alto ferro também foi analisado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) na tentativa de identificarmos alguma diferença morfológica entre as culturas. Entretanto, as células crescidas nos diferentes meios apresentaram-se muito parecidas.

Finalmente, avaliamos a concentração de açúcares totais associados ao biofilme das culturas de *Xylella* crescidas nos meios de estudo para acessar indiretamente a deposição de exopolissacarídeos totais, principais componentes do biofilme de bactérias (Flemming *et al.*, 2007; Flemming e Wingender, 2010). A maior deposição de biofilme observada nas culturas crescidas em meio com alta concentração de ferro poderia ser resultado de mais matriz exopolissacarídica do que, de fato, à deposição e multiplicação de biofilme total. Observou-se que as culturas crescidas em alto ferro apresentaram virtualmente a mesma quantidade de exopolissacarídeos totais associados ao biofilme do que as culturas crescidas em meio controle. Dessa forma, fica claro que a alta concentração de ferro estimulou a deposição de mais biofilme pelas culturas devido à multiplicação e deposição celular. Esse resultado pode estar refletindo uma estratégia de detoxificação de microambiente apresentada por bactérias no biofilme (Nishino *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2008a; Caserta *et al.*, 2010b), por conta das altas concentrações de ferro, que poderiam ter efeito tóxico. Ainda, a resposta observada pode estar refletindo um efeito estrutural que o ferro, assim como outros cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} , podem desempenhar, facilitando a formação do biofilme (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Song e Leff, 2006; Cruz *et al.*, 2012). Como *X. fastidiosa* não encontra altas concentrações de ferro ao longo do seu ciclo de vida é difícil discutir a relevância biológica do resultado observado. Mais estudos são necessários para compreender melhor a resposta observada de aumento de formação do biofilme em altas concentrações de ferro.

O ensaio de dosagem de exopolissacarídeos totais apresentou um resultado muito interessante para as culturas crescidas em meio com pouco ferro. Essas culturas, apesar de crescerem menos e formarem menos biofilme, depositaram cerca de duas vezes mais exopolissacarídeos totais na fração do biofilme que as crescidas em meio controle ou com alta concentração de ferro. Esse resultado se mostra muito interessante se considerarmos que *X. fastidiosa* vive em um ambiente com baixa concentração de nutrientes, entre eles o ferro. O meio com baixa concentração de ferro, uma vez simulando o ambiente do xilema

---

em que a bactéria se desenvolve, aponta um estímulo à produção de exopolissacarídeos por *X. fastidiosa*. Essa resposta já havia sido observada para outras bactérias, mas nunca para uma bactéria fitopatogênica. Os exopolissacarídeos são a base estrutural do biofilme, conferindo coesão estrutural para o biofilme (Flemming *et al.*, 2007; Flemming e Wingender, 2010). Para *X. fastidiosa* os exopolissacarídeos parecem ter função relevante para a estruturação do biofilme, principalmente no que tange a adesão e estruturação do biofilme. Ainda, esses compostos podem servir para ligar e estabilizar enzimas extracelulares, como as utilizadas por *X. fastidiosa* em seu processo de infecção, assim como servir de nutrientes para essa bactéria (Roper *et al.*, 2007a). Dessa forma, a concentração de ferro, como mostrado anteriormente por Zaini e colaboradores (2008), apresenta-se como um estímulo relevante para a expressão de fatores de virulência de *X. fastidiosa*, envolvendo desde a alteração do perfil de expressão de genes como os referentes a proteínas que compõem pilus tipo IV ou a toxinas bacterianas (colicinas) até o estímulo da produção de exopolissacarídeos, componentes do biofilme, um dos principais fatores de virulência de *X. fastidiosa* (Roper *et al.*, 2007a; Chatterjee *et al.*, 2008b; Janse e Obradovic, 2010).

---

6. Referências bibliográficas

1. **Alfano, J. R. e Collmer, A.** 2004. Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* 42:385-414.
2. **Almeida, R. P., Mann, R. e Purcell, A. H.** 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. *Curr Microbiol* 48:368-72.
3. **Almeida, R. P. P., Killiny, N., Newman, K. L., Chatterjee, S., Ionescu, M. e Lindow, S. E.** 2012. Contribution of *rpfB* to Cell-to-Cell Signal Synthesis, Virulence, and Vector Transmission of *Xylella fastidiosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25:453-462.
4. **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. e Lipman, D. J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
5. **Alves, E., Kitajima, E. W. e Leite, B.** 2003. Interaction of *Xylella fastidiosa* with different cultivars of *Nicotiana tabacum*: a comparison of colonization patterns. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 151:500-506.
6. **Amarasinghe, J. J., Scannapieco, F. A. e Haase, E. M.** 2009. Transcriptional and Translational Analysis of Biofilm Determinants of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in Response to Environmental Perturbation. *Infection and Immunity* 77:2896-2907.
7. **Andrews, P. C. a. S. C.** 2010. Iron uptake and homeostasis in microorganisms, Norfolk.
8. **Andrews, S. C., Robinson, A. K. e Rodriguez-Quinones, F.** 2003a. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215-37.
9. **Andrews, S. C., Robinson, A. K. e Rodriguez-Quinones, F.** 2003b. Bacterial iron homeostasis. *Fems Microbiology Reviews* 27:215-237.
10. **Arluisson, V., Mutyam, S. K., Mura, C., Marco, S. e Sukhodolets, M. V.** 2007. Sm-like protein Hfq: location of the ATP-binding site and the effect of ATP on Hfq- RNA complexes. *Protein Sci* 16:1830-41.
11. **Backus, E. A., Andrews, K. B., Shugart, H. J., Greve, L. C., Labavitch, J. M. e Alhaddad, H.** 2012. Salivary enzymes are injected into xylem by the glassy-winged sharpshooter, a vector of *Xylella fastidiosa*. *Journal of Insect Physiology* 58:949-959.
12. **Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. e Helmann, J. D.** 2002. Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* 45:1613-29.
13. **Barry, S. M. e Challis, G. L.** 2009. Recent advances in siderophore biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* 13:205-215.
14. **Bassler, B. L. e Losick, R.** 2006. Bacterially speaking. *Cell* 125:237-246.
15. **Bechet, M. e Blondeau, R.** 2003. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. *Journal of Applied Microbiology* 94:1072-1078.
16. **Belzer, C., van Schendel, B. A., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. e van Vliet, A. H.** 2007. Iron-responsive repression of urease expression in *Helicobacter hepaticus* is mediated by the transcriptional regulator Fur. *Infect Immun* 75:745-52.

17. **Benjamin, J. A., Desnoyers, G., Morissette, A., Salvail, H. e Masse, E.** 2010. Dealing with oxidative stress and iron starvation in microorganisms: an overview. *Can J Physiol Pharmacol* 88:264-72.
18. **Berlutti, F., Morea, C., Battistoni, A., Sarli, S., Cipriani, P., Superti, F., Ammendolia, M. G. e Valenti, P.** 2005. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 18:661-670.
19. **Berti, A. D. e Thomas, M. G.** 2009. Analysis of Achromobactin Biosynthesis by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *Journal of Bacteriology* 191:4594-4604.
20. **Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Ivanova, N., D'Souza, M., Bernal, A. et al.** 2002a. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12403-8.
21. **Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Ivanova, N., D'Souza, M., Bernal, A. et al.** 2002b. Whole-genome comparative analysis of three phytopathogenic *Xylella fastidiosa* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:12403-12408.
22. **Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Reznik, G., Feil, H., Feil, W. S. et al.** 2002c. Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Res* 12:1556-63.
23. **Bhattacharyya, A., Stilwagen, S., Reznik, G., Feil, H., Feil, W. S. et al.** 2002d. Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Research* 12:1556-1563.
24. **Bijlsma, J. J., Waidner, B., Vliet, A. H., Hughes, N. J., Hag, S., Bereswill, S., Kelly, D. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Kist, M. e Kusters, J. G.** 2002. The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect Immun* 70:606-11.
25. **Boughammoura, A., Expert, D. e Franza, T.** 2012. Role of the *Dickeya dadantii* Dps protein. *Biometals* 25:423-433.
26. **Boughammoura, A., Matzanke, B. F., Bottger, L., Reverchon, S., Lesuisse, E., Expert, D. e Franza, T.** 2008. Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *Journal of Bacteriology* 190:1518-1530.
27. **Boulette, M. L. e Payne, S. M.** 2007. Anaerobic regulation of *Shigella flexneri* virulence: ArcA regulates Fur and iron acquisition genes. *J Bacteriol* 189:6957-67.
28. **Bradford, M. M.** 1976. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
29. **Braun, V. e Hantke, K.** 2011. Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 15:328-334.
30. **Braun, V., Mahren, S. e Ogierman, M.** 2003. Regulation of the FecI-type ECF sigma factor by transmembrane signalling. *Current Opinion in Microbiology* 6:173-180.
31. **Bronstein, P. A., Filiatrault, M. J., Myers, C. R., Rutzke, M., Schneider, D. J. e Cartinhour, S. W.** 2008. Global transcriptional responses of *Pseudomonas syringae* DC3000 to changes in iron bioavailability in vitro. *Bmc Microbiology* 8.

-
32. **Brummer, Y. C., S. W.** . 2005. Understanding Carbohydrate Analysis. *In* S. W. Cui (ed.), Food Carbohydrates - Chemistry, Physical Properties, and Applications. CRC Press, Boca Raton.
  33. **Bullen, J., Griffiths, E., Rogers, H. e Ward, G.** 2000. Sepsis: the critical role of iron. *Microbes Infect* 2:409-15.
  34. **Butcher, B. G., Bronstein, P. A., Myers, C. R., Stodghill, P. V., Bolton, J. J., Markel, E. J., Filiatrault, M. J., Swingle, B., Gaballa, A., Helmann, J. D., Schneider, D. J. e Cartinhour, S. W.** 2011. Characterization of the Fur Regulon in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Journal of Bacteriology* 193:4598-4611.
  35. **Byrd, M. S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H. P., Sprinkle, A. B., Richardson, S. H., Ma, L. Y., Ralston, B., Parsek, M. R., Anderson, E. M., Lam, J. S. e Wozniak, D. J.** 2009. Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Molecular Microbiology* 73:622-638.
  36. **Cabiscol, E., Tamarit, J. e Ros, J.** 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology* 3:3-8.
  37. **Caiazza, N. C., Merritt, J. H., Brothers, K. M. e O'Toole, G. A.** 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 189:3603-3612.
  38. **Caiazza, N. C. e O'Toole, G. A.** 2004. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology* 186:4476-4485.
  39. **Carpenter, B. M., Whitmire, J. M. e Merrell, D. S.** 2009. This Is Not Your Mother's Repressor: the Complex Role of Fur in Pathogenesis. *Infection and Immunity* 77:2590-2601.
  40. **Caserta, R., Takita, M. A., Targon, M. L., Rosselli-Murai, L. K., de Souza, A. P., Peroni, L., Stach-Machado, D. R., Andrade, A., Labate, C. A., Kitajima, E. W., Machado, M. A. e de Souza, A. A.** 2010a. Expression of *Xylella fastidiosa* Fimbrial and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology* 76:4250-4259.
  41. **Caserta, R., Takita, M. A., Targon, M. L., Rosselli-Murai, L. K., de Souza, A. P., Peroni, L., Stach-Machado, D. R., Andrade, A., Labate, C. A., Kitajima, E. W., Machado, M. A. e de Souza, A. A.** 2010b. Expression of *Xylella fastidiosa* fimbrial and afimbrial proteins during biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 76:4250-9.
  42. **Cha, J. Y., Lee, J. S., Oh, J. I., Choi, J. W. e Baik, H. S.** 2008. Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 11528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366:281-287.
  43. **Challis, G. L.** 2005. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBiochem* 6:601-611.
  44. **Chan, D. I. e Vogel, H. J.** 2010. Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochemical Journal* 430:1-19.
  45. **Chang, C. J. e Donaldson, R. C.** 1993. *Xylella fastidiosa* - Cultivation in Chemically Defined Medium. *Phytopathology* 83:192-194.
  46. **Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V. e Bove, J. M.** 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus

- variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology* 27:137-142.
47. **Chatterjee, S., Almeida, R. P. e Lindow, S.** 2008a. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annu Rev Phytopathol* 46:243-71.
  48. **Chatterjee, S., Almeida, R. P. P. e Lindow, S.** 2008b. Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology* 46:243-271.
  49. **Chatterjee, S., Wistrom, C. e Lindow, S. E.** 2008c. A cell-cell signaling sensor is required for virulence and insect transmission of *Xylella fastidiosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2670-5.
  50. **Chen, J., Han, S., Civerolo, E., Stenger, D. C. e Van Sluys, M.** 2007. Two whole genome sequences of *Xylella fastidiosa* almond leaf scorch strains. *Phytopathology* 97:S21-S22.
  51. **Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. e Staskawicz, B. J.** 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814.
  52. **Chu, B. C., Garcia-Herrero, A., Johanson, T. H., Krewulak, K. D., Lau, C. K., Peacock, R. S., Slavinskaya, Z. e Vogel, H. J.** 2010. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 23:601-611.
  53. **Colnaghi Simionato, A. V., da Silva, D. S., Lambais, M. R. e Carrilho, E.** 2007. Characterization of a putative *Xylella fastidiosa* diffusible signal factor by HRGC-ESI-MS. *J Mass Spectrom* 42:490-6.
  54. **Cornelis, P.** 2010. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:1637-1645.
  55. **Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. e Lappinscott, H. M.** 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49:711-745.
  56. **Crosa, J. H.** 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:319-36.
  57. **Crosa, J. H. e Walsh, C. T.** 2002a. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66:223-+.
  58. **Crosa, J. H. e Walsh, C. T.** 2002b. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:223-49.
  59. **Cruz, L. F., Cobine, P. A. e De La Fuente, L.** 2012. Calcium Increases *Xylella fastidiosa* Surface Attachment, Biofilm Formation, and Twitching Motility. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1321-1331.
  60. **da Silva, F. G., Shen, Y. W., Dardick, C., Burdman, S., Yadav, R. C., de Leon, A. L. e Ronald, P. C.** 2004. Bacterial genes involved in type I secretion and sulfation are required to elicit the rice Xa21-mediated innate immune response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:593-601.
  61. **da Silva, F. R., Vettore, A. L., Kemper, E. L., Leite, A. e Arruda, P.** 2001. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *Fems Microbiology Letters* 203:165-171.
  62. **da Silva Neto, J. F., Braz, V. S., Italiani, V. C. e Marques, M. V.** 2009. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic

- alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Res* 37:4812-25.
63. **Danese, P. N., Pratt, L. A. e Kolter, R.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* 182:3593-3596.
64. **Davis, M. J., French, W. J. e Schaad, N. W.** 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. *Current Microbiology* 6:309-314.
65. **De La Fuente, L., Burr, T. J. e Hoch, H. C.** 2007. Mutations in type I and type IV pilus biosynthetic genes affect twitching motility rates in *Xylella fastidiosa*. *Journal of Bacteriology* 189:7507-7510.
66. **de Mello Varani, A., de Lima, W. C., Moreira, L. M., Oliveira, M., Souza, R. C., Civerolo, E., Vasconcelos, A. T. R. e Van Sluys, M. A.** 2009. Common Genes and Genomic Breaks: A Detailed Case Study of the *Xylella fastidiosa* Genome Backbone and Evolutionary Insights, p. 330. *In* R. W. Jackson (ed.), *Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norwich.
67. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta, H. D., Caldana, C., Goldman, G. H., Yanai, G. M., Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R. e Machado, M. A.** 2003. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:867-875.
68. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Coletta, H. D., Caldana, C., Yanai, G. M., Muto, N. H., de Oliveira, R. C., Nunes, L. R. e Machado, M. A.** 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *Fems Microbiology Letters* 237:341-353.
69. **de Souza, A. A., Takita, M. A., Pereira, E. O., Coletta-Filho, H. D. e Machado, M. A.** 2005. Expression of pathogenicity-related genes of *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Curr Microbiol* 50:223-8.
70. **Deighton, M. e Borland, R.** 1993. Regulation of Slime Production in *Staphylococcus-Epidermidis* by Iron Limitation. *Infection and Immunity* 61:4473-4479.
71. **Delany, I., Pacheco, A. B., Spohn, G., Rappuoli, R. e Scarlato, V.** 2001. Iron-dependent transcription of the *frpB* gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur repressor protein. *J Bacteriol* 183:4932-7.
72. **Dellagi, A., Brisset, M. N., Paulin, J. P. e Expert, D.** 1998. Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 11:734-42.
73. **Denny, T. P.** 1995. Involvement of Bacterial Polysaccharides in Plant Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33:173-197.
74. **Dobson, A. D. W., Power, T., Ortoneda, M. e Morrissey, J. P.** 2006. Differential expression of genes involved in iron metabolism in *Aspergillus fumigatus*. *International Microbiology* 9:281-287.
75. **Doddapaneni, H., Yao, J., Lin, H., Walker, M. A. e Civerolo, E. L.** 2006. Analysis of the genome-wide variations among multiple strains of the plant pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. *BMC Genomics* 7:225.
76. **Dow, J. M. e Daniels, M. J.** 2000. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* 17:263-271.
77. **Dow, J. M., Scofield, G., Trafford, K., Turner, P. C. e Daniels, M. J.** 1987. A GENE-CLUSTER IN *XANTHOMONAS-CAMPESTRIS* PV *CAMPESTRIS*

- REQUIRED FOR PATHOGENICITY CONTROLS THE EXCRETION OF POLYGALACTURONATE LYASE AND OTHER ENZYMES. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 31:261-271.
78. **Dow, M.** 2008. Diversification of the function of cell-to-cell signaling in regulation of virulence within plant pathogenic xanthomonads. *Sci Signal* 1:pe23.
79. **Drechsel, H. e Jung, G.** 1998. Peptide siderophores. *J Pept Sci* 4:147-81.
80. **Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. e Smith, F.** 1956. COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SUGARS AND RELATED SUBSTANCES. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
81. **Dubrac, S. e Touati, D.** 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* 182:3802-8.
82. **Dubrac, S. e Touati, D.** 2002. Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology* 148:147-56.
83. **Durrett, T. P., Gassmann, W. e Rogers, E. E.** 2007. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiol* 144:197-205.
84. **Eberl, L. e Tummeler, B.** 2004. Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *International Journal of Medical Microbiology* 294:123-131.
85. **Enard, C., Diolet, A. e Expert, D.** 1988. Systemic virulence of *Erwinia chrysanthemi* 3937 requires a functional iron assimilation system. *J Bacteriol* 170:2419-26.
86. **Enard, C. e Expert, D.** 2000. Characterization of a *tonB* mutation in *Erwinia chrysanthemi* 3937: TonB(Ech) is a member of the enterobacterial TonB family. *Microbiology* 146 (Pt 8):2051-8.
87. **Ernst, F. D., Bereswill, S., Waidner, B., Stoof, J., Mader, U., Kusters, J. G., Kuipers, E. J., Kist, M., van Vliet, A. H. e Homuth, G.** 2005. Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology* 151:533-46.
88. **Escobar, L., Perez-Martin, J. e de Lorenzo, V.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloreulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181:6223-9.
89. **Expert, D., Enard, C. e Masclaux, C.** 1996. The role of iron in plant host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 4:232-7.
90. **Flemming, H. C., Neu, T. R. e Wozniak, D. J.** 2007. The EPS matrix: The "House of Biofilm cells". *Journal of Bacteriology* 189:7945-7947.
91. **Flemming, H. C. e Wingender, J.** 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology* 43:9-16.
92. **Flemming, H. C. e Wingender, J.** 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8:623-633.
93. **Fogaca, A. C., Zaini, P. A., Wulff, N. A., da Silva, P. I. P., Fazio, M. A., Miranda, A., Daffre, S. e da Silva, A. M.** 2010. Effects of the antimicrobial peptide gomesin on the global gene expression profile, virulence and biofilm formation of *Xylella fastidiosa*. *Fems Microbiology Letters* 306:152-159.
94. **Francis, M., Civerolo, E. L. e Bruening, G.** 2008. Improved bioassay of *Xylella fastidiosa* strains using *Nicotiana tabacum* cultivar SR1. *Plant Disease* 92:14-20.

-
95. **Franza, T., Mahe, B. e Expert, D.** 2005. *Erwinia chrysanthemi* requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection. *Molecular Microbiology* 55:261-275.
  96. **Franza, T., Sauvage, C. e Expert, D.** 1999. Iron regulation and pathogenicity in *Erwinia chrysanthemi* 3937: role of the Fur repressor protein. *Mol Plant Microbe Interact* 12:119-28.
  97. **Fritsch, F. B., Lin, H. e Walker, M. A.** 2007. *Xylella fastidiosa* population dynamics in grapevine genotypes differing in susceptibility to Pierce's disease. *American Journal of Enology and Viticulture* 58:326-332.
  98. **Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K. e Nielsen, P. H.** 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30:1749-1758.
  99. **Goel, A. K., Rajagopal, L., Nagesh, N. e Sonti, R. V.** 2002. Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology* 184:3539-3548.
  100. **Govan, J. R. W. e Deretic, V.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological Reviews* 60:539-+.
  101. **Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G. e Genco, C. A.** 2003. Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9542-7.
  102. **Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. e Stoodley, P.** 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2:95-108.
  103. **Hantke, K.** 2001a. Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals* 14:239-49.
  104. **Hantke, K.** 2001b. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:172-7.
  105. **Heinrichs, J. H., Gatlin, L. E., Kunsch, C., Choi, G. H. e Hanson, M. S.** 1999. Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 181:1436-43.
  106. **Hider, R. C. e Kong, X. L.** 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* 27:637-657.
  107. **Hill, B. L. e Purcell, A. H.** 1995. Acquisition and Retention of *Xylella-Fastidiosa* by an Efficient Vector, *Graphocephala-Atropunctata*. *Phytopathology* 85:209-212.
  108. **Hill, B. L. e Purcell, A. H.** 1997. Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. *Phytopathology* 87:1197-1201.
  109. **Hood, M. I. e Skaar, E. P.** 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Reviews Microbiology* 10:525-537.
  110. **Hopkins, D. L.** 1977. Diseases Caused by Leafhopper-Borne, Rickettsia-Like Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 15:277-294.
  111. **Hopkins, D. L.** 1989. XYLELLA-FASTIDIOSA - XYLEM-LIMITED BACTERIAL PATHOGEN OF PLANTS. *Annual Review of Phytopathology* 27:271-290.
  112. **Hopkins, D. L. e Purcell, A. H.** 2002. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Disease* 86:1056-1066.

-
113. **Hu, N. T., Hung, M. N., Chiou, S. J., Tang, F., Chiang, D. C., Huang, H. Y. e Wu, C. Y.** 1992. CLONING AND CHARACTERIZATION OF A GENE REQUIRED FOR THE SECRETION OF EXTRACELLULAR ENZYMES ACROSS THE OUTER-MEMBRANE BY XANTHOMONAS-CAMPESTRIS PV CAMPESTRIS. *Journal of Bacteriology* 174:2679-2687.
  114. **Jackson, L. A., Ducey, T. F., Day, M. W., Zaitshik, J. B., Orvis, J. e Dyer, D. W.** 2010. Transcriptional and functional analysis of the *Neisseria gonorrhoeae* Fur regulon. *J Bacteriol* 192:77-85.
  115. **Jacques, J. F., Jang, S., Prevost, K., Desnoyers, G., Desmarais, M., Imlay, J. e Masse, E.** 2006. RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 62:1181-1190.
  116. **Janse, J. D. e Obradovic, A.** 2010. *Xylella Fastidiosa*: Its Biology, Diagnosis, Control and Risks. *Journal of Plant Pathology* 92:S35-S48.
  117. **Jayaraman, A. e Wood, T. K.** 2008. Bacterial quorum sensing: Signals, circuits, and implications for biofilms and disease, p. 145-167, *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 10. Annual Reviews, Palo Alto.
  118. **Jha, G., Rajeshwari, R. e Sonti, R. V.** 2005. Bacterial type two secretion system secreted proteins: Double-edged swords for plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:891-898.
  119. **Jittawuttipoka, T., Sallabhan, R., Vattanaviboon, P., Fuangthong, M. e Mongkolsuk, S.** 2010. Mutations of ferric uptake regulator (fur) impair iron homeostasis, growth, oxidative stress survival, and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Archives of Microbiology* 192:331-339.
  120. **Jones, A. M., Lindow, S. E. e Wildermuth, M. C.** 2007. Salicylic acid, yersiniabactin, and pyoverdine production by the model phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: Synthesis, regulation, and impact on tomato and *Arabidopsis* host plants. *Journal of Bacteriology* 189:6773-6786.
  121. **Jones, A. M. e Wildermuth, M. C.** 2011. The Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 Has Three High-Affinity Iron-Scavenging Systems Functional under Iron Limitation Conditions but Dispensable for Pathogenesis. *Journal of Bacteriology* 193:2767-2775.
  122. **Jurcisek, J. A. e Bakaletz, L. O.** 2007. Biofilms formed by nontypeable *Haemophilus influenzae* in vivo contain both double-stranded DNA and type IV pilin protein. *Journal of Bacteriology* 189:3868-3875.
  123. **Kay, S. e Bonas, U.** 2009. How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr Opin Microbiol* 12:37-43.
  124. **Khalil, S. e Pawelek, P. D.** 2011. Enzymatic adenylation of 2,3-dihydroxybenzoate is enhanced by a protein-protein interaction between *Escherichia coli* 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (EntA) and 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase (EntE). *Biochemistry* 50:533-45.
  125. **Kim, S. A. e Guerinot, M. L.** 2007. Mining iron: iron uptake and transport in plants. *FEBS Lett* 581:2273-80.
  126. **Kitphati, W., Ngok-Ngam, P., Suwanmaneerat, S., Sukchawalit, R. e Mongkolsuk, S.** 2007. *Agrobacterium tumefaciens* fur has important physiological roles in iron and manganese homeostasis, the oxidative stress response, and full virulence. *Appl Environ Microbiol* 73:4760-8.
  127. **Koczan, J. M., Lenneman, B. R., McGrath, M. J. e Sundin, G. W.** 2011. Cell Surface Attachment Structures Contribute to Biofilm Formation and Xylem

- Colonization by *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology* 77:7031-7039.
128. **Krewulak, K. D. e Vogel, H. J.** 2011. TonB or not TonB: is that the question? *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire* 89:87-97.
129. **Krivanek, A. F., Famula, T. R., Tenscher, A. e Walker, M. A.** 2005. Inheritance of resistance to *Xylella fastidiosa* within a *Vitis rupestris* x *Vitis arizonica* hybrid population. *Theoretical and Applied Genetics* 111:110-119.
130. **Lerat, E., Daubin, V., Ochman, H. e Moran, N. A.** 2005. Evolutionary origins of genomic repertoires in bacteria. *Plos Biology* 3:807-814.
131. **Li, G. L., Brown, P. J. B., Tang, J. X., Xu, J., Quardokus, E. M., Fuqua, C. e Brun, Y. V.** 2012. Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins. *Molecular Microbiology* 83:41-51.
132. **Li, W. B., Zreik, L., Fernandes, N. G., Miranda, V. S., Teixeira, D. C., Ayres, A. J., Garnier, M. e Bov, J. M.** 1999. A triply cloned strain of *Xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. *Curr Microbiol* 39:106-8.
133. **Li, X. Z., Nikaido, H. e Poole, K.** 1995. Role of Mexa-Mexb-OprM in Antibiotic Efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39:1948-1953.
134. **Li, Y. X., Hao, G. X., Galvani, C. D., Meng, Y. Z., De la Fuente, L., Hoch, H. C. e Burr, T. J.** 2007. Type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* affect twitching motility, biofilm formation and cell-cell aggregation. *Microbiology-Sgm* 153:719-726.
135. **Litwin, C. M. e Calderwood, S. B.** 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6:137-49.
136. **Liu, J., Duncan, K. e Walsh, C. T.** 1989. Nucleotide sequence of a cluster of *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis genes: identification of *entA* and purification of its product 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase. *J Bacteriol* 171:791-8.
137. **Livak, K. J. e Schmittgen, T. D.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25:402-8.
138. **Lubelski, J., Konings, W. N. e Driessen, A. J. M.** 2007. Distribution and physiology of ABC-Type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71:463-+.
139. **Mahren, S., Schnell, H. e Braun, V.** 2005. Occurrence and regulation of the ferric citrate transport system in *Escherichia coli* B, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Photobacterium luminescens*. *Archives of Microbiology* 184:175-186.
140. **Markowitz, V. M., Chen, I. M. A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J. H., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N. N. e Kyrpides, N. C.** 2012. IMG: the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Research* 40:D115-D122.
141. **Marshall, B., Stintzi, A., Gilmour, C., Meyer, J. M. e Poole, K.** 2009. Citrate-mediated iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the citrate-inducible *FecA* receptor and the *FeoB* ferrous iron transporter. *Microbiology-Sgm* 155:305-315.

-
142. **Masclaux, C. e Expert, D.** 1995. Signaling Potential of Iron in Plant-Microbe Interactions - the Pathogenic Switch of Iron Transport in *Erwinia-Chrysanthemi*. *Plant Journal* 7:121-128.
  143. **Masse, E. e Gottesman, S.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4620-5.
  144. **Masse, E., Salvail, H., Desnoyers, G. e Arguin, M.** 2007. Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr Opin Microbiol* 10:140-5.
  145. **McHugh, J. P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E. e Andrews, S. C.** 2003. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli* - A new mechanism for iron homeostasis. *Journal of Biological Chemistry* 278:29478-29486.
  146. **Meidanis, J., Braga, M. D. e Verjovski-Almeida, S.** 2002. Whole-genome analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:272-99.
  147. **Meng, Y. Z., Li, Y. X., Galvani, C. D., Hao, G. X., Turner, J. N., Burr, T. J. e Hoch, H. C.** 2005. Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *Journal of Bacteriology* 187:5560-5567.
  148. **Merrell, D. S., Thompson, L. J., Kim, C. C., Mitchell, H., Tompkins, L. S., Lee, A. e Falkow, S.** 2003. Growth phase-dependent response of *Helicobacter pylori* to iron starvation. *Infect Immun* 71:6510-25.
  149. **Metruccio, M. M., Fantappie, L., Serruto, D., Muzzi, A., Roncarati, D., Donati, C., Scarlato, V. e Delany, I.** 2009. The Hfq-dependent small noncoding RNA NrrF directly mediates Fur-dependent positive regulation of succinate dehydrogenase in *Neisseria meningitidis*. *J Bacteriol* 191:1330-42.
  150. **Meyer, J. M.** 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* 174:135-142.
  151. **Michel, A., Agerer, F., Hauck, C. R., Herrmann, M., Ullrich, J., Hacker, J. e Ohlsen, K.** 2006. Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. *J Bacteriol* 188:5783-96.
  152. **Moreau-Marquis, S., Bomberger, J. M., Anderson, G. G., Swiatecka-Urban, A., Ye, S. Y., O'Toole, G. A. e Stanton, B. A.** 2008. The Delta F508-CFTR mutation results in increased biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* by increasing iron availability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 295:L25-L37.
  153. **Moreira, L. D., Andrade, A. F. B., Vale, M. D., Souza, S. M. S., Hirata, R., Asad, U. M. O. B., Asad, N. R., Monteiro-Leal, L. H., Previato, J. O. e Mattos-Guaraldi, A. L.** 2003. Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 69:5907-5913.
  154. **Moreira, L. M., De Souza, R. F., Digiampietri, L. A., Da Silva, A. C. R. e Setubal, J. C.** 2005. Comparative analyses of *Xanthomonas* and *Xylella* complete genomes. *Omics-a Journal of Integrative Biology* 9:43-76.
  155. **Morris, C. E. e Monier, J. M.** 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41:429-453.

-
156. **Musk, D. J., Banko, D. A. e Hergenrother, P. J.** 2005. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology* 12:789-796.
157. **Nadarasah, G. e Stavrinides, J.** 2011. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. *Fems Microbiology Reviews* 35:555-575.
158. **Neves, E. M., Dayoub, M., Dragone, D. S. e Neves, M. F.** 2001. Brazilian Citrus industry: economic and financial effects, 1996-2000. *Rev. Bras. Frutic.* 23:432-436.
159. **Newman, K. L., Almeida, R. P., Purcell, A. H. e Lindow, S. E.** 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1737-42.
160. **Newman, K. L., Chatterjee, S., Ho, K. A. e Lindow, S. E.** 2008. Virulence of plant pathogenic bacteria attenuated by degradation of fatty acid cell-to-cell signaling factors. *Mol Plant Microbe Interact* 21:326-34.
161. **Nishino, K., Nikaido, E. e Yamaguchi, A.** 2007. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 189:9066-75.
162. **Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J. e Buchanan, S. K.** 2010. TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annual Review of Microbiology*, Vol 64, 2010 64:43-60.
163. **O'Toole, G. A. e Kolter, R.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology* 30:295-304.
164. **Ong, S. A., Peterson, T. e Neilands, J. B.** 1979. AGROBACTIN, A SIDEROPHORE FROM AGROBACTERIUM-TUMEFACIENS. *Journal of Biological Chemistry* 254:1860-1865.
165. **Pacheco, F. T. H., Silva-Stenico, M. E., Etcheagaray, A., Gomes, J. E., Carrilho, E. e Tsai, S. M.** 2006. Specific amplification of iron receptor genes in *Xylella fastidiosa* strains from different hosts. *Genetics and Molecular Biology* 29:137-141.
166. **Palmer, C. M. e Guerinot, M. L.** 2009. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol* 5:333-40.
167. **Pandey, A. e Sonti, R. V.** 2010. Role of the FeoB Protein and Siderophore in Promoting Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on Rice. *Journal of Bacteriology* 192:3187-3203.
168. **Paranjpye, R. N. e Strom, M. S.** 2005. A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infection and Immunity* 73:1411-1422.
169. **Pashalidis, S., Moreira, L. M., Zaini, P. A., Campanharo, J. C., Alves, L. M. C., Ciapina, L. P., Vencio, R. Z. N., Lemos, E. G. M., Da Silva, A. M. e da Silva, A. C. R.** 2005. Whole-genome expression profiling of *Xylella fastidiosa* in response to growth on glucose. *Omics-a Journal of Integrative Biology* 9:77-90.
170. **Perez-Donoso, A. G., Sun, Q., Roper, M. C., Greve, L. C., Kirkpatrick, B. e Labavitch, J. M.** 2010. Cell Wall-Degrading Enzymes Enlarge the Pore Size of Intervessel Pit Membranes in Healthy and *Xylella fastidiosa*-Infected Grapevines. *Plant Physiology* 152:1748-1759.
171. **Persmark, M., Expert, D. e Neilands, J. B.** 1989. ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND SYNTHESIS OF CHRYSOBACTIN, A

- COMPOUND WITH SIDEROPHORE ACTIVITY FROM ERWINIA-CHRYSAETHEMI. *Journal of Biological Chemistry* 264:3187-3193.
172. **Petrova, O. E. e Sauer, K.** 2012. Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. *Journal of Bacteriology* 194:2413-2425.
173. **Piel, J.** 2010. Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Natural Product Reports* 27:996-1047.
174. **Pierry, P. M.** 2012. Pirosequenciamento e análise comparativa de genomas do fitopatógeno *Xylella fastidiosa* Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 144p.
175. **Proft, T. e Baker, E. N.** 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66:613-635.
176. **Purcell, A. H. e Finlay, A.** 1979. EVIDENCE FOR NON-CIRCULATIVE TRANSMISSION OF PIERCE'S DISEASE BACTERIUM BY SHARPSHOOTER LEAFHOPPERS. *Phytopathology* 69:393-395.
177. **Purcell, A. H. e Hopkins, D. L.** 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 34:131-151.
178. **Purcell, A. H. e Saunders, S. R.** 1999. Fate of Pierce's disease strains of *Xylella fastidiosa* in common riparian plants in California. *Plant Disease* 83:825-830.
179. **Purcell, A. H., Saunders, S. R., Hendson, M., Grebus, M. E. e Henry, M. J.** 1999. Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. *Phytopathology* 89:53-58.
180. **Rabsch, W., Ma, L., Wiley, G., Najar, F. Z., Kaserer, W., Schuerch, D. W., Klebba, J. E., Roe, B. A., Laverde Gomez, J. A., Schallmey, M., Newton, S. M. e Klebba, P. E.** 2007. FepA- and TonB-dependent bacteriophage H8: receptor binding and genomic sequence. *Journal of Bacteriology* 189:5658-74.
181. **Ratledge, C. e Dover, L. G.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54:881-941.
182. **Ray, S. K., Rajeshwari, R. e Sonti, R. V.** 2000. Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* deficient in general secretory pathway are virulence deficient and unable to secrete xylanase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:394-401.
183. **Redak, R. A., Purcell, A. H., Lopes, J. R. S., Blua, M. J., Mizell, R. F. e Andersen, P. C.** 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annual Review of Entomology* 49:243-270.
184. **Reddy, J. D., Reddy, S. L., Hopkins, D. L. e Gabriel, D. W.** 2007. ToIC is required for pathogenicity of *Xylella fastidiosa* in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:403-410.
185. **Reddy, P. V., Puri, R. V., Khera, A. e Tyagi, A. K.** 2012. Iron Storage Proteins Are Essential for the Survival and Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 Macrophages and the Guinea Pig Model of Infection. *Journal of Bacteriology* 194:567-575.
186. **Reid, D. W., Anderson, G. J. e Lamont, I. L.** 2009. Role of lung iron in determining the bacterial and host struggle in cystic fibrosis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 297:L795-L802.
187. **Reid, D. W., Carroll, V., O'May, C., Champion, A. e Kirov, S. M.** 2007. Increased airway iron as a potential factor in the persistence of *Pseudomonas*

- aeruginosa infection in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal* 30:286-292.
188. **Reid, D. W. e Kirov, S. M.** 2004. Iron, *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis. *Microbiology-Sgm* 150:516-516.
189. **Rellán-Alvarez, R., Giner-Martínez-Sierra, J., Orduna, J., Orera, I., Rodríguez-Castrillon, J. A., García-Alonso, J. I., Abadía, J. e Álvarez-Fernández, A.** 2010. Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. *Plant Cell Physiol* 51:91-102.
190. **Rigano, L. A., Siciliano, F., Enrique, R., Sendin, L., Filippone, P., Torres, P. S., Questa, J., Dow, J. M., Castagnaro, A. P., Vojnov, A. A. e Marano, M. R.** 2007. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1222-1230.
191. **Roberson, E. B. e Firestone, M. K.** 1992. Relationship between Desiccation and Exopolysaccharide Production in a Soil *Pseudomonas* Sp. *Applied and Environmental Microbiology* 58:1284-1291.
192. **Rodrigues, C. M., Takita, M. A., Coletta-Filho, H. D., Olivato, J. C., Caserta, R., Machado, M. A. e de Souza, A. A.** 2008a. Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:1145-57.
193. **Rodrigues, C. M., Takita, M. A., Coletta-Filho, H. D., Olivato, J. C., Caserta, R., Machado, M. A. e de Souza, A. A.** 2008b. Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77:1145-1157.
194. **Roper, M., Greve, L., Labavitch, J. M. e Kirkpatrick, B. C.** 2006. Isolation, characterization, and detection of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 96:S100-S100.
195. **Roper, M. C., Greve, L. C., Labavitch, J. A. e Kirkpatrick, B. C.** 2007a. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7252-7258.
196. **Roper, M. C., Greve, L. C., Labavitch, J. M. e Kirkpatrick, B. C.** 2007b. Detection and visualization of an exopolysaccharide produced by *Xylella fastidiosa* in vitro and in planta. *Appl Environ Microbiol* 73:7252-8.
197. **Roper, M. C., Greve, L. C., Warren, J. G., Labavitch, J. M. e Kirkpatrick, B. C.** 2007c. *Xylella fastidiosa* requires polygalacturonase for colonization and pathogenicity in *Vitis vinifera* grapevines. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:411-419.
198. **Rossetti, V., Garnier, M., Bove, J. M., Beretta, M. J. G., Teixeira, A. R. R., Quaggio, J. A. e Denegri, J. D.** 1990. Occurrence of xylem-restricted bacteria in sweet orange trees affected by chlorotic variegation, a new citrus disease in Brazil. *Comptes Rendus de L Academie Des Sciences* 310:345-349.
199. **Rowe, M. C., Withers, H. L. e Swift, S.** 2010. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *Fems Microbiology Letters* 307:102-109.
200. **Rozen, S. e Skaletsky, H.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-86.
201. **Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., van der Lelie, D. e Dow, J. M.** 2009. The versatility and

- adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat Rev Microbiol* 7:514-25.
202. **Saier, M. H.** 2006. Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *Journal of Membrane Biology* 214:75-90.
203. **Salvail, H. e Masse, E.** 2012. Regulating iron storage and metabolism with RNA: an overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* 3:26-36.
204. **Santana, W. O.** 2012. Genômica comparativa de *Xylella fastidiosa*. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
205. **Scarpari, L. M., Lambais, M. R., Silva, D. S., Carraro, D. M. e Carrer, H.** 2003. Expression of putative pathogenicity-related genes in *Xylella fastidiosa* grown at low and high cell density conditions in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 222:83-92.
206. **Schreiber, H. L., Koirala, M., Lara, A., Ojeda, M., Dowd, S. E., Bextine, B. e Morano, L.** 2010. Unraveling the First *Xylella fastidiosa* subsp *fastidiosa* Genome from Texas. *Southwestern Entomologist* 35:479-483.
207. **Schwyn, B. e Neilands, J. B.** 1987. Universal Chemical-Assay for the Detection and Determination of Siderophores. *Analytical Biochemistry* 160:47-56.
208. **Setubal, J. C., Moreira, L. M. e da Silva, A. C.** 2005. Bacterial phytopathogens and genome science. *Curr Opin Microbiol* 8:595-600.
209. **Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K. S., Kodama, T. e Honda, T.** 2006. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *Fems Microbiology Letters* 264:89-97.
210. **Silva-Stenico, M. E., Pacheco, F. T. H., Rodrigues, J. L. M., Carrilho, E. e Tsai, S. M.** 2005. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. *Microbiological Research* 160:429-436.
211. **Simionato, A. V. C., Silva-Stenico, M. E., Tsai, S. M. e Carrilho, E.** 2010. Evidences of Siderophores Synthesis by Grapevine *Xylella fastidiosa*, Causal Agent of Pierce's Disease, through Instrumental Approaches. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21:635-641.
212. **Simpson, A. J., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M. et al.** 2000a. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-7.
213. **Simpson, A. J. G., Reinach, F. C., Arruda, P., Abreu, F. A., Acencio, M. et al.** 2000b. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406:151-157.
214. **Smith, J. L.** 2004. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 30:173-185.
215. **Smits, T. H. M. e Duffy, B.** 2011. Genomics of iron acquisition in the plant pathogen *Erwinia amylovora*: insights in the biosynthetic pathway of the siderophore desferrioxamine E. *Archives of Microbiology* 193:693-699.
216. **Song, B. e Leff, L. G.** 2006. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiological Research* 161:355-361.
217. **Sonti, R. V. e Pandey, A.** 2010. Role of the FeoB Protein and Siderophore in Promoting Virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* on Rice. *Journal of Bacteriology* 192:3187-3203.
218. **Souza, L. C. A., Wulff, N. A., Gaurivaud, P., Mariano, A. G., Virgilio, A. C. D., Azevedo, J. L. e Monteiro, P. B.** 2006. Disruption of *Xylella fastidiosa*

- CVC gumB and gumF genes affects biofilm formation without a detectable influence on exopolysaccharide production. Fems Microbiology Letters 257:236-242.
219. **Stravrinides, J.** 2009. Origin and evolution of phytopathogenic bacteria. In R. W. Jackson (ed.), Plant pathogenic bacteria - genomics and molecular biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
220. **Subramoni, S. e Sonti, R. V.** 2005. Growth deficiency of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* fur mutant in rice leaves is rescued by ascorbic acid supplementation. Mol Plant Microbe Interact 18:644-51.
221. **Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. e Ichinose, Y.** 2010. The Siderophore Pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 Is an Intrinsic Virulence Factor in Host Tobacco Infection. Journal of Bacteriology 192:117-126.
222. **Thompson, G. D., Gibson, T. J. e Higgins, D. G.** 2002. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Current Protocols in Bioinformatics:2.3.1–2.3.22.
223. **Touati, D.** 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. Arch Biochem Biophys 373:1-6.
224. **Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. e Udesen, C.** 2004. The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. Mol Microbiol 51:1525-33.
225. **Van Sluys, M. A., de Oliveira, M. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Miyaki, C. Y., Furlan, L. R. et al.** 2003a. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. J Bacteriol 185:1018-26.
226. **Van Sluys, M. A., de Oliveira, M. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Miyaki, C. Y., Furlan, L. R. et al.** 2003b. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. Journal of Bacteriology 185:1018-1026.
227. **Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P. e Simpson, A. J.** 2002. Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. Annual Review of Phytopathology 40:169-189.
228. **Varani, A. D., Souza, R. C., Nakaya, H. I., de Lima, W. C., de Almeida, L. G. P., Kitajima, E. W., Chen, J., Civerolo, E., Vasconcelos, A. T. R. e Van Sluys, M. A.** 2008. Origins of the *Xylella fastidiosa* Prophage-Like Regions and Their Impact in Genome Differentiation. Plos One 3.
229. **Varga, J. J., Therit, B. e Melville, S. B.** 2008. Type IV Pili and the CcpA Protein Are Needed for Maximal Biofilm Formation by the Gram-Positive Anaerobic Pathogen *Clostridium perfringens*. Infection and Immunity 76:4944-4951.
230. **Vojnov, A. A., do Amaral, A. M., Dow, J. M., Castagnaro, A. P. e Marano, M. R.** 2010. Bacteria causing important diseases of citrus utilise distinct modes of pathogenesis to attack a common host. Applied Microbiology and Biotechnology 87:467-477.
231. **Wall, D. e Kaiser, D.** 1999. Type IV pili and cell motility. Molecular Microbiology 32:1-10.
232. **Wang, L. H., He, Y., Gao, Y., Wu, J. E., Dong, Y. H., He, C., Wang, S. X., Weng, L. X., Xu, J. L., Tay, L., Fang, R. X. e Zhang, L. H.** 2004. A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. Mol Microbiol 51:903-12.

-
233. **Waters, L. S. e Storz, G.** 2009. Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell* 136:615-628.
234. **Watnick, P. I. e Kolter, R.** 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology* 34:586-595.
235. **Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelcopaul, L. e Brenner, D. J.** 1987. XYLELLA-FASTIDIOSA GEN-NOV, SP-NOV - GRAM-NEGATIVE, XYLEM-LIMITED, FASTIDIOUS PLANT BACTERIA RELATED TO XANTHOMONAS-SPP. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37:136-143.
236. **Wiggerich, H. G. e Puhler, A.** 2000. The *exbD2* 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 (Pt 5):1053-60.
237. **Woese, C. R.** 1987. BACTERIAL EVOLUTION. *Microbiological Reviews* 51:221-271.
238. **Wulff, N. A., Carrer, H. e Pascholati, S. F.** 2006. Expression and purification of cellulase Xf818 from *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* 53:198-203.
239. **Yang, L., Barken, K. B., Skindersoe, M. E., Christensen, A. B., Givskov, M. e Tolker-Nielsen, T.** 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology-Sgm* 153:1318-1328.
240. **Yokosho, K., Yamaji, N., Ueno, D., Mitani, N. e Ma, J. F.** 2009. OsFRDL1 is a citrate transporter required for efficient translocation of iron in rice. *Plant Physiol* 149:297-305.
241. **Zaini, P. A.** 2007a. O stimulon de ferro em *Xylella fastidiosa*. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 101p.
242. **Zaini, P. A.** 2007b. O stimulon de ferro em *Xylella fastidiosa*. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 101p.
243. **Zaini, P. A., De La Fuente, L., Hoch, H. C. e Burr, T. J.** 2009. Grapevine xylem sap enhances biofilm development by *Xylella fastidiosa*. *Fems Microbiology Letters* 295:129-134.
244. **Zaini, P. A., Fogaca, A. C., Lupo, F. G., Nakaya, H. I., Vencio, R. Z. e da Silva, A. M.** 2008a. The iron stimulon of *Xylella fastidiosa* includes genes for type IV pilus and colicin V-like bacteriocins. *J Bacteriol* 190:2368-78.
245. **Zaini, P. A., Fogaca, A. C., Lupo, F. G. N., Nakaya, H. I., Vencio, R. Z. N. e da Silva, A. M.** 2008b. The iron stimulon of *Xylella fastidiosa* includes genes for type IV pilus and colicin V-like bacteriocins. *Journal of Bacteriology* 190:2368-2378.
246. **Zambrano, N., Guichard, P. P., Bi, Y., Cayrol, B., Marco, S. e Arluison, V.** 2009. Involvement of HFq protein in the post-transcriptional regulation of *E. coli* bacterial cytoskeleton and cell division proteins. *Cell Cycle* 8:2470-2.
247. **Zemanick, E. T., Sagel, S. D. e Harris, J. K.** 2011. The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Current Opinion in Pediatrics* 23:319-324.
248. **Zhang, S., Flores-Cruz, Z., Kumar, D., Chakrabarty, P., Hopkins, D. L. e Gabriel, D. W.** 2011. The *Xylella fastidiosa* Biocontrol Strain EB92-1 Genome

-
- Is Very Similar and Syntenic to Pierce's Disease Strains. *Journal of Bacteriology* 193:5576-5577.
249. **Zhao, Y. C., Qian, G. L., Yin, F. Q., Fan, J. Q., Zhai, Z. W., Liu, C. H., Hu, B. S. e Liu, F. Q.** 2011. Proteomic analysis of the regulatory function of DSF-dependent quorum sensing in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. *Microbial Pathogenesis* 50:48-55.
250. **Zheng, P., Sun, J., Geffers, R. e Zeng, A. P.** 2007. Functional characterization of the gene PA2384 in large-scale gene regulation in response to iron starvation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biotechnol* 132:342-52.

Súmula Curricular

Gustavo Antônio Teixeira Chaves

Nascimento: 13/06/1988 – Anápolis, GO, Brasil

Formação Acadêmica

- 2006 - 2010**   Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado)
Universidade Federal de Brasília, UNB, Brasília, DF, Brasil
- 2010 -2012**   Curso de Mestrado, Programa de Ciências Biológicas (Bioquímica).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Orientadora: Profa. Dra. Aline Maria da Silva
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
-

Formação complementar

- 2006-2008**   Iniciação Científica
Universidade Federal de Brasília, UNB, Brasília, DF, Brasil
Orientadoras: Profa. Dra. Egle Machado de Almeida Siqueira
Profa. Dra. Sandra Fernandes Arruda
Bolsista do CNPq
- 2011-2011**   Monitor do VI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular do IQ-USP
-

Comunicações em Congressos

Chaves, G. A. T., Zaini, P. A. & da Silva, A. M. "Iron Uptake and Siderophore Utilization in *Xylella fastidiosa*" XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu, PR.

Publicações

Chaves, G. A. T., Zaini, P. A. & da Silva, A. M. Iron as regulator of virulence in plant pathogenic bacteria. Ed: L. De La Fuente IN: Virulence mechanisms of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society Press. 2013. (em preparação).