

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Análise de expressão gênica de *Xylella fastidiosa* cultivada em diferentes
concentrações de glicose pela técnica de *microarrays* de DNA**

Stefano Pashalidis

Dissertação de Mestrado

Orientadora : Ana Cláudia Rasesa da Silva

SÃO PAULO

17 de outubro de 2005

“Análise de expressão gênica de *Xylella fastidiosa* cultivada em diferentes concentrações de glicose pela técnica de microarrays de DNA”

STEFANO PASHALIDIS

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

Aprovado(a) por:

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

Profa. Dra. REGINA LÚCIA BALDINI
IQ – USP

Profa. Dra. ANDREA CRISTINA FOGAÇA
IQ – USP

Este trabalho é dedicado aos meus pais como uma mínima retribuição por todo amor, dedicação, confiança e ensinamentos que me proporcionaram o cumprimento de mais um objetivo.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Ana Claudia Raser da Silva pela orientação e confiança depositadas ao longo destes anos e ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos meus pais, Hristos Ilias Pashalidis e Ana Maria Cecchele Pashalidis, que tanto acreditaram em mim e só por eles que estou aqui. Obrigado pelo amor e apoio incondicional que vocês sempre me deram. Aos meus irmãos Ilias, Arturo e Hrisoula, meu muito obrigado por me aturarem e pelo apoio.

A professora Aline pelo apoio imprescindível no final do trabalho.

Agradeço também ao grande amigo que fiz aqui dentro da USP, que sempre esteve ao meu lado, e que além de um excelente doutorando mostrou-se um excelente amigo, sempre disponível para consultas e do qual hoje tenho uma grande amizade: Leandro Marcio Moreira.

Aos colaboradores de Jaboticabal –SP, chefiados pela Prof. Dra. Eliana Lemos: em especial ao João Carlos Campanharo, Luciane Ciapina e Lúcia Alves.

Ao amigo que hoje está em Belo Horizonte, Jean Marcel, pela sua grande amizade e ótimas conversas. Ao Róbson pela ajuda que sempre deu quando precisei. Ao Paulo Zaini pela força. A minha amiga Tatiana, sempre presente em minha vida.

Aos amigos Fernando Ariel Genta e Luis Fernando Lotalora, que me deram um apoio imprescindível em momento de estudo.

A todos que passaram ou ainda estão por aqui: Alex William, Júlio “Peruano”, Rcinaldinho, Dcodoro, Fernando Fortes, Ilda, Isaura, Adriana Carvalho, Adriana Matsukuma, Denise, Ricardo, Tié, Cássia, Maria Cláudia.

Aos professores Pio Colepícolo e Ernani pelo apoio moral e pelo incentivo.

Índice

Resumo	2
1 – Introdução	3
2 – Objetivos	11
3 – Artigo Publicado na Revista OMICS	12
4 – Discussão	26
4.1 – Análise Geral do transcriptoma de <i>Xf</i> em resposta ao nível de glicose do meio	26
4.2 – Regulação e síntese de goma e de fatores de virulência mediados por genes <i>rpf</i>	28
4.3 – Colicinas	30
5 – Conclusão	33
6 – Referências Bibliográficas	34

Análise de expressão gênica de *Xylella fastidiosa* cultivada em diferentes concentrações de glicose pela técnica de *microarrays* de DNA

Resumo

Xylella fastidiosa (*Xf*) é o agente etiológico causador de doenças em uma grande variedade de cultivos de grande importância econômica, causando a clorose variegada dos citros, uma das doenças mais danosas à indústria de citros no Brasil. Os genomas de algumas cepas deste fitopatógeno foram completamente seqüenciados promovendo assim estudos funcionais do genoma em larga escala. Neste trabalho nós nos propusemos a investigar o perfil de transcrição de *Xf* através da técnica *microarrays* (no título da dissertação *microarrays*, mas a partir de agora usaremos *microarrays*) de DNA usando todo o genoma do fitopatógeno e cultivando-a sob meio definido variando a concentração de glicose. O objetivo inicial deste trabalho era observar se *Xf* comportava-se da mesma forma que *Xac*, que tem a expressão de goma aumentada devido ao aumento da concentração de glicose do meio. Nossas análises revelaram que enquanto os transcritos relacionados à goma não se mostraram afetados com a concentração de glicose, genes que codificam para análogos a Colicina-V e precursores de fímbria foram induzidos em alta concentração de glicose. Baseados nestes resultados, nós propusemos um modelo de mecanismo de produção e defesa contra a Colicina em *Xf*.

1 - Introdução

Xylella fastidiosa (*Xf*) é uma proteobactéria gram-negativa membro da subdivisão gama, ordem *Xanthomonadales*, família *Xanthomonadaceae* e gênero *Xylella*. *Xf* é uma bactéria limitada ao xilema (XLB) (Purcell & Hopkins 1996) que se caracteriza como o agente etiológico de doenças importantes que geram grande perda econômica anualmente (Purcell & Hopkins 1996). Dentre as doenças causadas por *Xf*, destacam-se a Doença de Pierce em videiras (PD) e a Clorose Variegada dos Citros (CVC) (Banks et al 1999; Henderson et al 2001; Purcell & Hopkins 1996). No Brasil, a CVC merece atenção especial pelo fato do país ser o principal produtor mundial de suco de laranja e por ser uma doença que atinge a maior parte das variedades de citros comerciais. (<http://www.ic.unicamp.br/genoma/xylella.html>). A CVC foi identificada oficialmente em 1987, em pomares do Triângulo Mineiro e do Norte e Noroeste do Estado de São Paulo (fundecitrus website). Embora essas sejam as regiões mais afetadas até hoje, ela já está presente em quase todas as áreas citrícolas do país, mas com intensidades diferentes (fundecitrus website). Segundo dados da Fundecitrus, em 2004, no Estado de São Paulo, pelo menos 42% dos pomares de laranjas apresentavam sintomas da contaminação por *Xf*, sendo aproximadamente 7% com sintomas do nível 1 (restrito as folhas), enquanto 35% já apresentavam sintomas foliares acompanhados de frutos miúdos (sintomas do nível 2). Ainda segundo a Fundecitrus, a população de plantas infectadas aparenta não estar aumentando em termos percentuais, mas os sintomas de nível 2 se mostram cada vez mais evidentes, o que tende a prejudicar ainda mais a produção citrícola.

Morfologicamente *Xf* apresenta formato bacilar com tamanho médio entre 0.3 - 0.5 µm de diâmetro e 3 - 5 µm em comprimento, e mesmo em condições estressantes não é capaz de formar esporos (Holt 1994; Wells JM 1981). Resultados *in vitro* têm demonstrado que *Xf* precisa crescer por um período mínimo de 6 dias em temperatura ao redor de 28°C para que se possa ter uma concentração celular viável para trabalhos biomoleculares (Bextine et al 2004; Lemos et al 2003). *Xf* tem em seu nome a indicação de um tipo de bactéria que necessita de um meio complexo e que tem o seu crescimento vagaroso *in vitro*, daí a denominação fastidiosa. Na tentativa de minimizar o tempo dispendido para o cultivo de *Xf*, uma série de meios de cultura vem sendo desenvolvidos (Almeida et al 2004; Lemos et al 2003).

Embora várias cepas de *Xf* sejam classificadas como pertencente a apenas uma espécie, estudos baseados na comparação de seqüências dos genes ribossomais (16, 23 e 5S) de seus genomas têm sugerido a existência de múltiplas espécies (Schaad et al 2004). Algumas cepas de *Xf* já foram parcial ou completamente seqüenciadas (Bhattacharyya et al 2002a; Simpson et al 2000; Van Sluys et al 2003) e permitiram o estudo funcional dos genomas através das análises de transcriptomas e proteomas, provendo argumentos para o entendimento da fisiologia e patogenicidade deste organismo, bem como a especificidade de hospedeiro (de Souza et al 2003; de Souza et al 2004; Koide et al 2004; Nunes et al 2003; Smolka et al 2003).

O ciclo de infecção e propagação de *Xf* é dependente de vetores conhecidos como cigarrinhas, insetos sugadores que se alimentam de um grande número de espécies vegetais. Durante o processo de sucção da seiva vegetal, estes insetos previamente contaminados por *Xf* depositam-na ao entrar em contato com o tecido vegetal de uma planta sadia. Só na cultura de citros existem aproximadamente de 60 a 70 espécies de cigarrinhas que podem ser classificadas como possíveis vetores (www.fundecitrus.com.br). Dentro do xilema, dependendo do número de bactérias que se agrupam e da formação e tamanho do biofilme, pode ocorrer o impedimento do fluxo normal de água para a planta, conferindo o estresse por água típico da CVC (McElrone et al 2003; Redak et al 2004). Cabe aqui dizer que o biofilme é caracterizado por uma matriz de microrganismos que, aliados com substâncias, criam um micro-ambiente onde a nutrição e defesa destes organismos são favorecidas.

O bloqueio no fluxo de seiva causado por este biofilme parece ser o fator que acarreta os sintomas clássicos da doença que incluem clorose na região entre nervuras foliares, redução do tamanho dos frutos seguidos de uma consistência pétrea (Li et al 1999). Já foi proposto que os exopolissacarídeos (EPS), em especial a goma fastidiana, e as fimbrias estejam envolvidas no processo de fixação de *Xf* ao xilema e na sua sobrevivência no trato digestório anterior do inseto (Bhattacharyya et al 2002b; da Silva et al 2001; Newman et al 2004). Estas fimbrias teriam o papel de promover a adesão de *Xf* tanto no trato do inseto como no xilema da planta, já que o fluxo dos nutrientes em ambos os locais tenderiam a dificultar a fixação de qualquer organismo neste ambiente (Newman et al 2004).

Xf cepa 9a5c foi o primeiro fitopatógeno a ter o seu genoma completamente seqüenciado (Simpson et al 2000). Possui um cromossomo circular de aproximadamente 2.6 milhões de pares de bases (Mpb) contendo 2782 CDS (*coding sequence*), com conteúdo de GC em torno de 52% (Simpson et al 2000). Do total de CDS encontradas, 1283 CDS têm uma provável função associada, 1083 CDS não possuem identidades significantes (hipotéticas) e 310 CDS hipotéticas conservadas. *Xf* ainda possui dois plasmídeos, pXF1.3 que contém apenas 2 CDS e pXF51 que contém 64 CDS (Simpson et al 2000). Como os dados provêm de uma publicação realizada em março de 2000, muito provavelmente estes valores encontram-se atualmente modificados em decorrência do crescente número de genomas que vem sendo completa ou parcialmente seqüenciados (TIGR) e de validações de funções gênicas por análises funcionais. Embora este trabalho tenha interesse de descrever mais profundamente as características referentes de *Xf* 9a5c e a CVC, mais recentemente o agente etiológico da *Pierce Disease* (*Xf* Temecula) também teve seu genoma completamente seqüenciado (Van Sluys et al 2003). Neste trabalho ficou evidenciado que a informação gênica contida em ambos os organismos é muito parecida, salvo algumas restrições como inserções de fagos e rearranjos na ordem dos genes.

A análise do genoma de *Xf* demonstrou que uma série de vias metabólicas apresenta-se ausente ou fragmentada, embora possua a via glicolítica, o ciclo do ácido tricarboxílico, a cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa completas. *Xf* também possui a maquinaria de transcrição, tradução e reparo de DNA similar a de *E. coli* (Simpson et al 2000). Entre as ausências, destacam-se genes envolvidos com a gliconeogênese, beta-oxidação e um reduzido número de genes que codificam para enzimas de degradação de parede celular de plantas, o que reflete a sua dependência de um vetor animal.

Xf possui um *cluster* gênico responsável pela síntese de um polímero denominada goma fastidiana, que seria análogo à goma xantana, descrito previamente em *Xantomonas campestris pv campestris* (*Xcc*) (Jansson et al 1975), considerado o organismo modelo para o estudo deste polímero. Em *Xcc*, a goma xantana caracteriza-se como um exopolissacarídeo (EPS) de alto peso molecular composto por uma estrutura central celulósica com cadeias laterais de trissacarídeos ligados e alternados por resíduos de glicose (Fu & Tseng 1990). As cadeias laterais são compostas por dois resíduos de manose e um de ácido glucurônico (Jansson et al 1975). Esta composição fornece a este EPS uma alta viscosidade e estabilidade mesmo em ambientes de condições químicas e físicas extremas, representadas, por exemplo,

por serem amortecedores de impactos em grandes perfurações de solo e por grande aplicabilidade no setor alimentício e cosmético, portanto apresentando-se como um produto de extrema aplicabilidade e interesse econômico (Kennedy 1984; Sandford 1983). Este cluster em *Xf* contém nove genes em *tandem* (*gumBCDEFHJKM*), ao passo que em *Xcc* este número eleva-se para 12, com a adição dos genes *gumG*, *gumI* e *gumL* (da Silva et al 2001; Dow & Daniels 2000). O gene *gumG* está provavelmente relacionado com a adição de manose, *gumI* codifica para uma glicosiltransferase que é responsável pela incorporação da manose terminal, e o gene *gumL* codifica para uma enzima cetol piruvato transferase, responsável por inserir um grupo piruvato junto ao polissacarídeo (Katzen et al 1998). A ausência destes genes sugere que *Xf* tenha uma goma menos viscosa que a de *Xcc* (da Silva et al 2001; Simpson et al 2000), embora nenhuma evidência experimental tenha comprovado esta hipótese. Os genes *gumD*, *gumH*, *gumK* e *gumM* estão envolvidos na composição de um complexo intermediário pentassacarídeo-lipídeo ao passo que os genes *gumB*, *gumC*, *gumE* e *gumJ* estão relacionados com polimerização e transporte.

Em *Xcc* a produção de goma xantana é regulada positivamente pela expressão dos genes *rpf* (reguladores de patogenicidade) e pela variação na concentração de açúcares do meio, em especial glicose, sacarose, maltose, celobiose, manose e xilose (Vojnov et al 2001). Particularmente a regulação via genes *rpf* é dada principalmente pelos genes *rpfF* e *rpfB*, responsáveis pela produção de fatores de difusão de sinais conhecidos como *DSF* (*Diffusible Signal Factor*) (Slater et al 2000). Estas moléculas DSF apresentam função análoga aos N-acil-homoseril-lactonas (HLS) que estão relacionados com eventos de *Quorum Sensing* em bactérias (Miller & Bassler 2001) que é descrito como um fenômeno onde bactérias conseguem comunicar-se através de moléculas produzidas por outras bactérias com a finalidade de organizarem-se para um mesmo comportamento, respondendo à situação externa da melhor forma possível.

Xf também possui estes genes *rpf*, porém com uma organização gênica diferente da observada em *Xcc* (da Silva et al 2001). Há uma inserção entre os genes *rpfF* e *rpfB* de 780kb, que sugere uma possibilidade de atuação diferente do que proposto em *Xcc* (Moreira et al 2004). Tendo como referencial a síntese de goma mediada por *rpf* e açúcares em *Xcc*, o objetivo inicial deste trabalho era descobrir se a regulação da produção de goma em *Xf* também seria mediada pela concentração de glicose e pela regulação dos genes *rpf*.

Recentemente trabalhos têm demonstrado que os genes *rpf* se relacionam diretamente com a produção de biofilme em *Xcc* através de eventos de *Quorum Sensing*. (Crossman & Dow 2004). Classicamente o biofilme caracteriza-se como um ambiente onde as bactérias se comunicam e convergem para uma mesma expressão gênica induzida pela comunicação entre elas (Miller & Bassler 2001). É nele que as bactérias passam a produzir uma série de proteínas com função de adesão, proteção e comunicação, dentre elas as proteínas responsáveis pela síntese de pili, que participa da ligação e comunicação entre bactérias (O'Toole & Kolter 1998). Em *Xf*, acredita-se que o biofilme formado durante a propagação intra-vaso de *Xf* é crucial para a virulência da bactéria (Coletta-Filho et al 2001; Newman et al 2003; Osiro et al 2004; Simpson et al 2000) e este biofilme pode ser decorrente das atividades de goma e mesmo da síntese de pili. Mais uma vez, compreender a regulação dos genes de goma em diferentes concentrações de açúcar pode dar indícios de como este biofilme é formado e, conseqüentemente, a sua importância para a patogenicidade de *Xf* poderá ser melhor compreendida.

O seqüenciamento de *Xf* 9a5c, além das informações acima descritas, também revelou a ausência do sistema secretório tipo III ou sistema Hrp (Simpson et al 2000). Entre as bactérias fitopatogênicas seqüenciadas até o momento (TIGR) apenas *Xf* e *Agrobacterium tumefaciens* não o possuem. Esta maquinaria, tanto em patógenos vegetais quanto animais possui a capacidade de transpor as membranas celulares bacterianas e penetrar na célula hospedeira de maneira análoga a uma seringa, com a capacidade de injetar no interior do hospedeiro proteínas efetoras (proteínas avr) (Wood et al 2004). Estas proteínas efetoras possuem seqüências definidas que as tornam capazes de interagir com proteínas de reconhecimento específicas do hospedeiro, desencadeando sucessivas reações intracelulares (Alfano & Collmer 2004). Em hospedeiros vegetais estas reações se divergem em duas respostas primárias distintas. A primeira resposta dá-se pela compatibilidade entre patógeno e hospedeiro, proporcionando a caracterização da doença propriamente dita após colonização e propagação do patógeno na planta. A planta, por sua vez, reage proporcionando uma resposta sistêmica (SAR) de combate à infecção, com a geração de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e com a produção de metabólitos secundários capazes de provocar danos em alguns microorganismos. A segundo tipo de resposta vegetal dá-se pela incompatibilidade entre patógeno e hospedeiro, que acaba limitando a ação do patógeno no local da infecção, por induzir morte celular programada ao redor do tecido lesado (Alfano & Collmer 2004).

Esta resposta é classicamente conhecida como resposta de hipersensibilidade ou simplesmente HR.

A ausência do sistema secretório tipo III em *Xf* pode estar relacionada ao ambiente em que ela vive (xilema). Por aproveitar o fluxo de nutrientes para a sua nutrição e por se alojar na cavidade do vaso, não necessita atacar diretamente o hospedeiro, como observado em *Xcc*. Ao mesmo tempo em que esta ausência reduz a virulência de *Xf*, permite prolongar sua subsistência no interior da planta.

O mecanismo de virulência de *Xf* pode ainda incluir toxinas, antibióticos e sistemas de captura de íons (Dow & Daniels 2000; Simpson et al 2000), embora ainda estejam pouco caracterizados. Um dos tipos de toxinas que *Xf* produz e faremos uma proposição mais adiante neste mesmo trabalho, é a Colicina V. De maneira geral, as Colicinas se caracterizam como sendo polipeptídeos produzidos por um grande número de bactérias e que são capazes de controlar o crescimento de espécies correlacionadas, reduzindo a competição por nutrientes dentro de um ambiente restrito (Havarstein et al 1994). Estruturalmente a Colicina V é caracterizada por ser um polipeptídeo que ativo tem tamanho pequeno, com aproximados 100 resíduos de aminoácidos (Pugsley 1984), com a capacidade de formar um poro na membrana das bactérias que não são capazes de inativar sua atividade. Este poro promove um desbalanço na concentração intracelular de íons e conseqüentemente a lise da célula (Zhang et al 1995). Genes que codificam para a síntese de Colicina V em *E.coli* estão inseridos no plasmídeo pColV-K30 e são reguladas por genes *cvpA-purF* (Fath et al 1989). Em ambos os fitopatógenos, *Xf* e *Xanthomonas axonopodis pv citri* (*Xac*), foram encontrados os genes regulatórios *cvpA-purF*, agrupados em um *cluster*, mostrando um alto grau de conservação e sintenia (XAC1029-32 e XF1946-49) (Moreira et al 2004). Entretanto, em *Xac* os genes *cvaC* e *cvaA* estão ausentes. Estes genes representam, respectivamente, um precursor da síntese de colicina, presente em três cópias em *tandem* no genoma de *Xf*, e uma proteína da família MFP (proteína de fusão de membrana) envolvida com a secreção deste composto. No caso do gene *cvaA*, sua ausência in *Xac* é caracterizada por uma inserção de um *transposon* (Moreira et al 2004).

Com o intuito de gerar mais conhecimento e agregar valor a todo trabalho de seqüenciamento de *Xf*, criou-se o grupo *CAGE Xylella* (Cooperação para Análise de Expressão Gênica de *Xf*), dentro do IQ-USP, com a finalidade de analisar transcritos de *Xf*

cultivadas em diferentes condições, através da técnica de microarranjos de DNA. Esta técnica permite uma análise global em dos níveis de expressão em milhares de genes, provenientes de organismos ou tecidos e células em diferentes situações fisiológicas e patológicas, bem como a análise de polimorfismo e mutações em genomas completos (Pollack et al 1999; Schena et al 1995; Shalon et al 1996). As novas técnicas de seqüenciamento, aprimoradas nos últimos anos, promoveram um aumento no número de genomas seqüenciados e com isso o microarranjo de DNA tem sido uma técnica que mais favorece uma rápida análise funcional de genes (em nível de transcritos), que na maioria das vezes não apresentam funções bem definidas. Isto pode ser observado em praticamente todos os genomas onde aproximadamente 50% de suas CDS apresentam-se como hipotéticas. Esta técnica ainda permite a seleção de alguns genes que poderão ser melhor analisados via qRT-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*).

Os *microarranjos* de DNA consistem em uma superfície plana, podendo ser uma membrana de nylon, nitrocelulose ou uma lâmina de vidro, que recebem fragmentos de DNA, os chamados alvos, provenientes de produtos de PCR ou oligonucleotídeos depositados ou sintetizados *in situ* (Fukushima 1999). Em geral, cada ponto impresso na superfície, corresponde a um gene específico. Este alvo de DNA imobilizado na superfície pode ser hibridizado por sondas de cDNA ou mesmo DNA provenientes de diferentes condições celulares ou diferentes cepas, respectivamente marcados previamente com diferentes fluoróforos. Estes fluoróforos são excitados e emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda e, por isso, podem ser analisados simultaneamente por varredura com laser, em seus respectivos espectros (Duggan et al 1999; Tu et al 2004). Onde houver um sinal captado, corresponde a um evento de hibridização sonda-alvo capaz de gerar valores numéricos posteriormente organizados em tabelas. As diferenças ou similaridades encontradas podem explicar em que condições tais genes são expressos, possibilitando inferir uma função a eles que podem ser analisados em maior profundidade por outras técnicas (Sherlock 2000; Yue et al 2001). A figura abaixo (figura i) representa a seqüência do trabalho de microarranjo de DNA desde a captação da intensidade do fluoróforo, normalização, análise dos dados (tabelas) e sua concatenação gerando os níveis de expressão de cada gene.

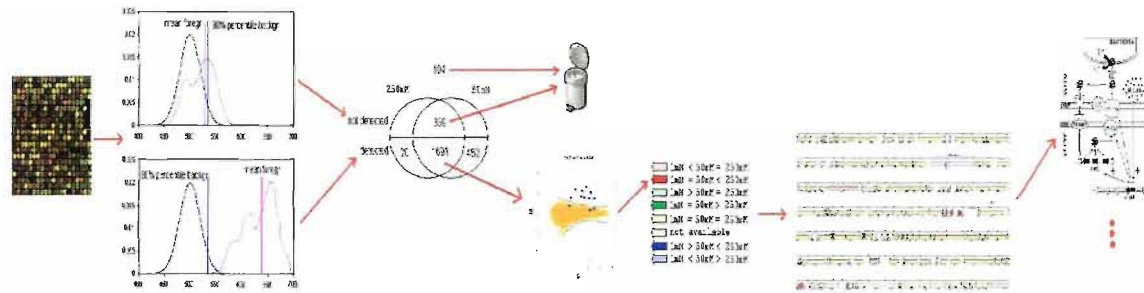


Figura i: da esquerda para a direita, varredura da lâmina com as respectivas emissões de intensidade de cada hibridização sonda-alvo; análise de cada ponto da lâmina relacionando-o com os ruídos próprios de cada ponto (excluindo-o ou não da análise posterior); diagrama de Venn com os dados válidos gerados; disposição dos dados relacionando razão e soma das intensidades de cada ponto da lâmina; variação de expressão dos genes; recriação do mapa genômico (agora com cores) usando dados de expressão sob as condições definidas; resultado final da análise de um gene de interesse, postulando uma condição de maior expressão.

2 – Objetivos

O objetivo deste trabalho é analisar a variação da expressão gênica de *Xf* cepa 9a5c em diferentes concentrações de glicose., através da técnica de microarranjos de DNA.

3- Artigo

OMICS - A Journal of Integrative Biology
Volume 9, Number 1, 2005
© Mary Ann Liebert, Inc.

Whole-Genome Expression Profiling of *Xylella fastidiosa* in Response to Growth on Glucose

*STEFANO PASHALIDIS,¹ *LEANDRO M. MOREIRA,¹ *PAULO A. ZAINI,¹
JOÃO C. CAMPANHARO,² LÚCIA M.C. ALVES,² LUCIANE P. CIAPINA,²
RICARDO Z.N. VÊNCIO,³ ELIANA G.M. LEMOS,² ALINE M. DA SILVA,¹
and ANA C.R. DA SILVA¹

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is the etiologic agent of diseases in a wide range of economically important crops including citrus variegated chlorosis, a major threat to the Brazilian citrus industry. The genomes of several strains of this phytopathogen have been completely sequenced enabling large-scale functional studies. In this work we used whole-genome DNA microarrays to investigate the transcription profile of *X. fastidiosa* grown in defined media with different glucose concentrations. Our analysis revealed that while transcripts related to fastidian gum production were unaffected, colicin-V-like and fimbria precursors were induced in high glucose medium. Based on these results, we suggest a model for colicin-defense mechanism in *X. fastidiosa*.

INTRODUCTION

XYLELLA FASTIDIOSA IS A GRAM-NEGATIVE XYLEM-LIMITED BACTERIUM which is the etiologic agent of economically important plant diseases, such as Pierce's disease of grapevines (PD) and citrus variegated chlorosis (CVC) (Tyson et al., 1985; Chang et al., 1993; Hopkins and Purcell, 2002). The latter is a major concern to the citrus industry, being responsible for annual losses over \$100 million. CVC is considered one of the most devastating citrus diseases and according to Fundecitrus (www.fundecitrus.com.br), of the 180 million productive trees, 70 million will be affected during the next five years.

Upon transmission from infected plants by xylem sap-feeding sharpshooter leafhoppers, *X. fastidiosa* spreads systemically throughout the plant and attaches to xylem vessel walls. Depending on size, these biofilm-like colonies eventually occlude the vascular system, leading to the water-stress symptoms typical of CVC (Roberto et al., 1996; McElrone et al., 2001). Furthermore, it has been proposed that the fastidian exopolysaccharide and fimbriae are involved in the bacterial attachment and survival in the plant as well as in the insect vector (da Silva et al., 2001; Feil et al., 2003; Newman et al., 2004). Thus, the formation

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Tecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil.

³BIOINFO-USP-Núcleo de Pesquisas em Bioinformática, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*These authors contributed equally to this work.

of biofilm is currently accepted as a crucial factor in the pathogenicity of *X. fastidiosa* (Simpson et al., 2000; Machado et al., 2001; Newman et al., 2003; Osiro et al., 2004). Virulence mechanism might also include toxins, antibiotics and ion sequestration systems (Dow and Daniels, 2000; Simpson et al., 2000), but these remain poorly characterized.

Several *X. fastidiosa* strains have had their genomes completely or partially sequenced and comparative genome analysis of different strains pointed to common virulence determinants as well as strain-specific genomic signatures (Simpson et al., 2000; Bhattacharyya et al., 2002; Nunes et al., 2003; Van Sluys et al., 2003; Koide et al., 2004). These genome sequence data paved the way for high-throughput functional studies such as transcriptome and proteome analyses in an effort to improve our understanding of physiology and pathogenicity of this organism (de Souza et al., 2003; Nunes et al., 2003; Smolka et al., 2003; de Souza et al., 2004; Koide et al., 2004).

In this work we used full-genome DNA microarrays to investigate the transcription profile of *X. fastidiosa* grown in defined media with different glucose concentrations. Our analysis revealed that while transcripts related to fastidial gum production were unaffected, colicin-V-like and fimbria precursors were induced in high glucose medium. Based on these results we suggest a model for colicin-defense mechanism in *X. fastidiosa*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and growth conditions

Triplically cloned *X. fastidiosa* strain 9a5c (Li et al., 1999) isolated from citrus variegated chlorosis (CVC) symptomatic *Citrus sinensis* (L.) Osbeck trees (sweet orange) was grown on solid XDM₂ medium (Lemos et al., 2003) at 28°C in the dark. Cells with less than 20 passages were used. After 6 days (late log-phase) of growth, cells were collected and washed in liquid XDM₂ medium without glucose. A 1 mL aliquot of the cell suspension was then plated in XDM₂ with defined glucose concentrations (1, 50, and 250 mM) and grown for 6 more days for total RNA isolation.

To monitor the growth at different concentrations of glucose, the cultures were prepared as described above until the washing step, and then transferred to liquid XDM₂ medium with defined glucose concentrations. Samples were taken every 4 days during 12 days. Growth was monitored by measuring the optical density of resuspended cells and by total protein content. For this, samples were resuspended in 1.0 mL of sonication buffer (10mM Tris-HCl and 5mM MgCl₂, pH 7.0) by vortexing. A 50- μ L aliquot was removed and diluted in 950 μ L of water for measurement of optical density at 600 nm. The remaining cells were sonicated (Sonifier Branson, model 250 at 85W) in an ice water-bath for 5 min, and the extract was clarified by centrifugation at 10,600 \times g for 10 min at 4°C and total protein was estimated by the Hartree assay (Hartree, 1972).

Microarray construction, fluorescent labeling, and hybridization

A 6152-element DNA microarray containing unique internal fragments of 2692 CDS spotted at least in duplicate, representing 94.5% of all the 2848 CDS annotated by Simpson et al. (2000) was constructed as previously described (Koide et al., 2004). Expression profiling studies were carried out labeling 20 μ g of total RNA with indocarbocyanine or indodicarbocyanine (Cy3 or Cy5) using Cy-Scribe Post Labeling kit (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions. Total RNA from 6-day cultures was extracted with TRIzol (Invitrogen), treated with RQ1 DNase I (Promega). Complete removal of genomic DNA was evaluated by PCR.

Fluorescent cDNAs were combined and denatured by heating to 95°C for 2 min and quickly chilled on ice. The targets were then applied to the microarray slide and covered with a 24 \times 60 mm coverslip (Corning). The hybridization proceeded for 16 h at 42°C. The slides were then washed in 1 \times SSC + 0.2% SDS for 10 min at 55°C, twice in 0.1 \times SSC + 0.2% SDS also for 10 min at 55°C, 0.1 \times SSC for 1 min at room temperature and finally in deionized water for 1 min at room temperature and dried with N₂ gas.

Data acquisition, ratio normalization, and statistical analysis

Microarray slides were scanned using a Generation III DNA scanner (GE Healthcare) and fluorescence intensity values from each spot were extracted using ArrayVision 7.0 software (Imaging Research Inc.). We used the usual “reference design”, with the 50 mM glucose growth condition as the reference, and prepared three biological replicates for each growth condition (Churchill, 2002). Each microarray slide has at least two technical replicates measured for both channels and, therefore, each CDS has at least $3 \times 2 \times 2 = 12$ intensity measures. A CDS is defined as “detectable” if the majority of its intensity measurements are brighter than the 90% percentile of its surrounding background intensity. In microarray context, a given CDS intensity measurement cannot be detected significantly above its local background due to a series of reasons ranging from limitations on dynamic range or high level of local background hybridization, to real lack of transcriptional activity. On the other hand, a given CDS successfully detected can have its intensity value due to unspecific hybridization or artifacts. We deemed detected CDS as being transcriptionally active but we do not call the not detected CDS as not transcribed acknowledging the limitations above. Since our hybridization stringency is relatively high and the array was constructed with specific primers (Koide et al., 2004), we believe that our “detectable thus expressed” approximation is reasonable.

The \log_2 -ratio results are calculated only for those CDS that could be detected in both co-hybridized conditions. CDS that could be observed only in one condition relative to other are treated separately since are differentially expressed but do not have measurable expression ratio. Data normalization was carried out essentially as previously described by Koide et al. (2004) using LOWESS fitting on M versus S plot, where M is the \log_2 -ratio of background subtracted fluorescence intensities ($I_{C_{y3}}$ and $I_{C_{y5}}$), defined as $M = \log_2(I_{C_{y5}}/I_{C_{y3}})$, and S is the logarithm of the average intensity, defined as $S = \log_2(I_{C_{y5}}/2 + I_{C_{y3}}/2)$ (see supplemental Figs. S1.1–S1.23).

To determine hybridization noise and to estimate dynamic cutoff values for classifying a CDS according to its relative expression levels we used the hybridization data collected from two duplicated biological replicates of self-self hybridization (independent harvest of *X. fastidiosa* grown at 50 mM glucose). The intensity-dependent noise-threshold cutoff values were obtained according to the rationale introduced by Koide et al. (2004), with the improvements described in <http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/HTself>. We used a sliding window of size 1.0, step 0.2 and defined 0.995 credibility intervals. A CDS was considered as consistently differentially expressed if the majority of its M replicated measurements were outside of the 0.995 curves defined by the self-self hybridizations. Using these criteria, up- or down-regulated categories were defined for samples grown at 1 mM and at 250 mM glucose (see supplemental Fig. S2). The complete data set is publicly available under the MIAME guidelines (Brazma et al., 2001) at supplemental web site (<http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray/glucose>).

Real-time quantitative RT-PCR

cDNA was generated from 5 μ g of total RNA using 200 U of SuperscriptII reverse transcriptase (Invitrogen) and 500 ng of random nonamer primers, according to the manufacturer’s instructions. cDNA was diluted with nuclease free water to 35 $\text{ng}/\mu\text{L}$ and stored at -20°C before use. Real-time quantitative PCR was performed using an ABI PRISM 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using default parameters. The PCR mixture included 10 μL of Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), 800 nM forward and reverse primers and 180ng template cDNA. In order to confirm the generation of specific PCR products, the PCR was immediately followed by melting curve analysis of the RT-PCR product according to the manufacturer’s recommendations (Applied Biosystems). Primers were purchased from Bio-Synthesis, Inc. Primers for amplification of XF0305 or XF2157 were used as endogenous controls to normalize the amount of total RNA per sample. The fold-change of each gene was calculated by using the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method, as described by Livak and Schmittgen (2001) from three independent experiments. We considered a CDS differentially expressed relative to 50mM glucose standard condition if the mean minus one standard deviation on obtained fold-change exceeded the 1.5-fold value cutoff. PCR primers were designed with PRIMER EXPRESS 2.0 software (Applied Biosystems), and their sequences are given in Table 1.

TABLE 1. GENES AND PRIMERS USED IN REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

Gene ID ^a	Gene name	Primers
XF0262	<i>cvaC</i>	F 5'GGCGGTATTGCTGGTGCTAT R 5'AGCGAAGGTGCCGTTAAAGA
XF0287	<i>rpfB</i>	F 5'CGGGCTTCGACAAACTTGA R 5'GACGGAGCGCTGGATCAC
XF0305	<i>nuoA</i>	F 5'TTCATCGTGCCTTGGACTCA R 5'CAGCGCTCCCTTCTTCCATA
XF1115	<i>rpfF</i>	F 5'GCTTGGAGGAGGCITCGAA R 5'CACCCCTTCCTCAGCTACGA
XF2361	<i>gumK</i>	F 5'GCATGCATCTTTCGGTATTGC R 5'CAAAGCGTGTCCGATAAGAG
XF2157	<i>dnaQ</i>	F 5'GGTGCCGAACGTGATTATTACA R 5'CAACCGCGATAACTCGTAATCAA

^aSimpson et al. (2000).

DNA and protein sequence analysis

DNA and protein sequence similarity searches were done with BLAST tools (Altschul et al., 1997) at the NCBI databases and at the *X. fastidiosa* 9a5c genome sequencing consortium database (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf/>). Sequence alignment was performed with CLUSTAL W software (Thompson et al., 1994). Protein secondary structure prediction was done with NNPREPDICTION software (Kneller et al., 1990).

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of *X. fastidiosa* growth at different concentrations of glucose

The recent development of defined media for *X. fastidiosa* (Campanharo et al., 2003; Lemos et al., 2003; Almeida et al., 2004; Leite et al., 2004) allowed us to examine the growth kinetics and global gene expression under different glucose concentrations. As shown in Figure 1, growth in XDM₂ containing 1 mM and 250 mM glucose is strikingly different compared to standard XDM₂, which has 50 mM glucose. After 8 days of growth, cell density reached OD₆₀₀ ~1.2 at the standard conditions and was 3–4-fold lower at 1 mM and 250 mM glucose. It can also be observed that cultures grown at low glucose reach the stationary phase within 4 days of growth while this stage is only reached after 8 days at the standard conditions. Interestingly, even after 12 days the stationary phase was not reached for cultures grown at 250 mM glucose. Their log phase was delayed for ~8 days, possibly when glucose declined to optimal levels. In all of the conditions the cellular density correlated well with total protein content. This correlation suggests that *X. fastidiosa* does not alter synthesis of fastidian gum (exopolysaccharide) in response to glucose variations.

Global analysis of *X. fastidiosa* gene expression in response to glucose concentration

We next monitored global transcription profiles of *X. fastidiosa* grown in XDM₂ with 1, 50, and 250 mM glucose. For this we used DNA microarrays representing 94.5% of the 2848 previously annotated coding sequences (CDS) (Simpson et al., 2000; Koide et al., 2004). The microarray slides were competitively hybridized with fluorescently labeled cDNA prepared from RNA samples of 6 day-old cultures. As detailed in Materials and Methods, we considered a CDS as expressed if its intensity measurements were consistently and significantly above the local background. As represented in the diagrams of Figure 2, the analysis of hybridization data show that 2143 CDS were considered expressed at 50mM glucose. On the other hand, only 554 and 1711 CDS were expressed by *X. fastidiosa* cells grown at 1 mM and 250 mM, respectively. These results show that when *X. fastidiosa* was grown in 1 mM glucose XDM₂ an enormous set of

WHOLE-GENOME EXPRESSION PROFILING OF *XYLELLA FASTIDIOSA*

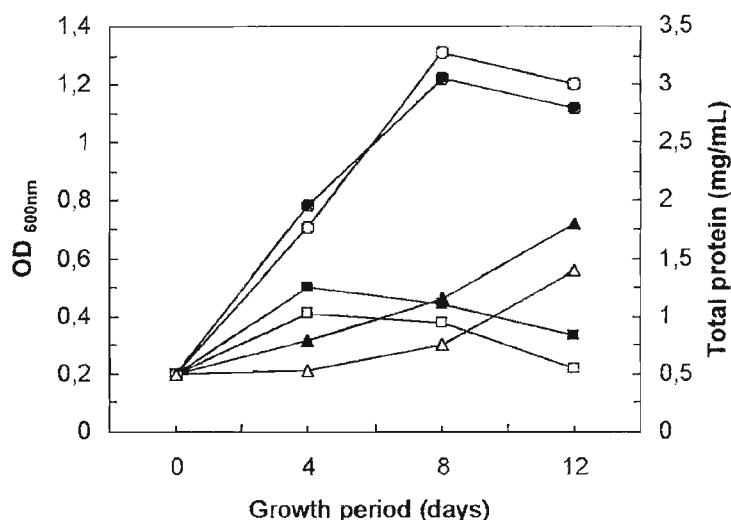


FIG. 1. Growth curves of *Xylella fastidiosa* 9a5c in XDM₂ medium with different concentrations of glucose. Closed symbols represent optical density readings at 600 nm. Open symbols represent total protein content. Squares, circles and triangles represent cultures grown at 1, 50, and 250 mM of glucose, respectively.

transcripts were down-regulated compared to the standard medium. This effect was also observed in cells growing in 250 mM glucose, though to a lesser extent. CDS expressed in each condition are listed in supplemental Table S1 and represented on interactive transcriptome maps that summarize all our hybridization results at the project site (<http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray/glucose>). The transcriptome maps provide an overview of genome activity in each hybridization condition, enriched with additional information on each CDS. The project site also offers raw and normalized data and additional information on data collection, processing and statistical analysis.

In addition, the gene expression profiles revealed that 211 out of 551 sequences (see supplemental Table S2), that had been considered invalid CDS in the re-annotation of *X. fastidiosa* strain 9a5c genome (Van Sluys et al., 2002), were transcriptionally active in the standard XDM₂ medium. The fact that we have detected transcriptional activity of these predicted CDS demonstrates the usefulness of DNA microarrays as a complementary tool to validate genome annotations. Given 187 of these expressed CDS are conserved in *X. fastidiosa* strain Temecula, responsible for Pierce's disease in grapevines, we intend to reannotate these CDS as conserved hypotheticals.

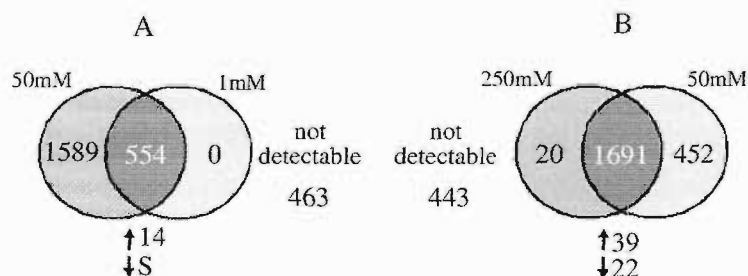


FIG. 2. Gene expression changes in three glucose concentrations. The number of CDSs expressed in cells grown at 50 versus 1 mM (A), and 50 versus 250 mM glucose (B). White numbers correspond to CDS detected in both conditions, for which differential expression analysis was performed. The number of up- and down-regulated CDS in each condition are indicated below the circles. Undetectable CDS were excluded from further analysis.

Functional characteristics of differentially expressed genes in response to growth on glucose

As mentioned above, transcriptional activity was drastically reduced in *X. fastidiosa* cells grown at 1 mM glucose given that a total of 1589 CDS were not expressed. Moreover, cells grown at 250 mM glucose also reduced the overall number of expressed genes considering 452 CDS were not expressed. Even though these large sets of CDS (supplemental Table S1) should be assigned as differentially expressed relative to growth at 50mM, their precise hybridization ratios were not be calculated. Therefore, the biological implication of these observations will not be addressed in this work. We chose to analyze differentially expressed genes exclusively with genes expressed in both conditions and for these precise ratios were calculated (Fig. 2). When comparing 50 mM versus 1 mM, 14 and 8 out of 554 CDS were found to be up- and down-regulated, respectively (Tables 2 and S3). When 50 mM versus 250 mM were compared, 39 and 22 out of 1691 CDS were up- and down-regulated, respectively (Tables 3 and S3).

Among the 14 CDS up-regulated in 1 mM glucose listed in Table 2, we highlight one that encodes a sugar ABC transporter ATP-binding protein (XF1067) and another that encodes an ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (XF1187). This protease assembles into a disk-like structure with a central cavity, resembling the structure of eukaryotic proteasomes (Kessel et al., 1995). Interestingly, Clp-dependent proteolysis has been recently linked to general bulk protein breakdown at the transition from growing to non-growing phases in *B. subtilis* (Kock et al., 2004).

Table 3 presents the 39 CDS found to be up-regulated upon growth in 250 mM glucose. Twenty-six of them were annotated as hypothetical or conserved hypothetical. Eleven of these reside between CDS XF1648 and XF1693 that comprises a region denoted as XfP4 (for phage number 4). Although the region harboring CDS XF1648-XF1657 is currently not annotated as belonging to this phage, we suspect this phage region starts at CDS XF1642 and not at XF1658 as currently proposed (Simpson et al., 2000). XF1642 encodes a phage integrase whose genomic location is indicative of an island or horizontally transferred region in *X. fastidiosa* 9a5c (Moreira et al., 2004). Expression of phage sequences have been shown to be under the control of nutrient availability in a microarray comparison of *X. fastidiosa* grown in rich and nutrient-limited media (Nunes et al., 2003).

Other up-regulated genes in this condition include XF0395, XF1189, XF2234 and XF2625. The first encodes bacterioferritin, an intracellular reservoir of ferric iron, the second an ATP-dependent serine endopeptidase (Lon), and the other two encode heat shock proteins. This observation suggests *X. fastidiosa* might be undergoing some kind of stress due to growth on high glucose concentration. In *Pseudomonas aeruginosa*, bacterioferritin has been proposed to be involved indirectly in the resistance to redox stress

TABLE 2. UP-REGULATED GENES AT 1 mM GLUCOSE.

<i>Gene ID</i> ^a	<i>Product</i>	<i>Gene name</i>	<i>Ratio</i>
XF0094	Cell division protein	<i>fisJ</i>	1.6
XF0388	Hypothetical protein	—	2.0
XF0561	Hypothetical protein	—	2.0
XF1067	Sugar ABC transporter ATP-binding protein	DR2153	1.9
XF1187	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	<i>clpP</i>	2.1
XF1189	ATP-dependent serine proteinase La	<i>lopA</i>	1.8
XF1530	Subunit C of alkyl hydroperoxide reductase	<i>ahpC</i>	1.9
XF1554	Fumarate hydratase	<i>fumC</i>	1.9
XF1693	Hypothetical protein	—	2.1
XF1796	Bifunctional transcriptional repressor of the biotin operon/ biotin acetyl-CoA-carboxylase synthetase	<i>birA</i>	1.4
XF1810	Conserved hypothetical protein	HI0961	2.0
XF2377	Hypothetical protein	—	2.0
XFa0034	Conserved hypothetical protein	STMD1.84	1.8
XFb0001	Replication protein	—	2.1

^aSimpson et al. (2000).

WHOLE-GENOME EXPRESSION PROFILING OF *XYLELLA FASTIDIOSA*

TABLE 3. UP-REGULATED GENES AT 250 mM GLUCOSE

<i>Gene ID</i> ^a	<i>Product</i>	<i>Gene name</i>	<i>Ratio</i>
XF0032	PilY1 gene product	<i>pilY1</i>	2.1
XF0261	Colicin V immunity protein ^b	<i>cvi</i>	2.3
XF0262	Colicin V precursor	<i>cvaC</i>	2.5
XF0264	Colicin V precursor ^b	<i>cvaC</i>	2.4
XF0395	Bacterioferritin	<i>bfr</i>	2.3
XF0667	Hypothetical protein	—	1.9
XF0700	Hypothetical protein	—	2.3
XF0703	Hypothetical protein	—	2.0
XF1189	ATP-dependent serine proteinase La	<i>lopA</i>	1.7
XF1217	Hypothetical protein	—	3.0
XF1224	PilY1 gene product	<i>pilY1</i>	2.2
XF1287	Hypothetical protein	—	2.0
XF1550	Oxoglutarate dehydrogenase	<i>odhA</i>	1.5
XF1556	Hypothetical protein	—	1.8
XF1648	Hypothetical protein	—	3.6
XF1649	Conserved hypothetical protein	b2360	3.1
XF1650	Hypothetical protein	—	2.3
XF1655	Hypothetical protein	—	2.6
XF1659	Hypothetical protein	—	3.9
XF1661	Hypothetical protein	—	2.8
XF1662	Hypothetical protein	—	2.0
XF1663	Phage-related protein	—	1.9
XF1673	Hypothetical protein	—	2.4
XF1683	Hypothetical protein	—	2.0
XF1693	Hypothetical protein	—	2.4
XF1754	Conserved hypothetical protein	<i>orf1</i>	2.1
XF1948	Colicin V production protein	<i>cvpA</i>	2.0
XF2005	Hypothetical protein	—	1.8
XF2173	Hypothetical protein	—	2.0
XF2234	Low molecular weight heat shock protein	<i>hspA</i>	2.7
XF2377	Hypothetical protein	—	2.0
XF2380	Hypothetical protein	—	2.0
XF2510	Hypothetical protein	—	2.8
XF2550	Outer membrane hemolysin activator protein	<i>hecB</i>	1.6
XF2625	Heat shock protein	<i>hspX</i>	2.5
XFa0024	Hypothetical protein	—	1.8
XFa0033	Hypothetical protein	—	1.6
XFa0045	Conserved hypothetical protein	—	1.6
XFb0001	Replication protein	—	2.1

^aSimpson et al. (2000).

^bCurrently annotated as hypothetical proteins.

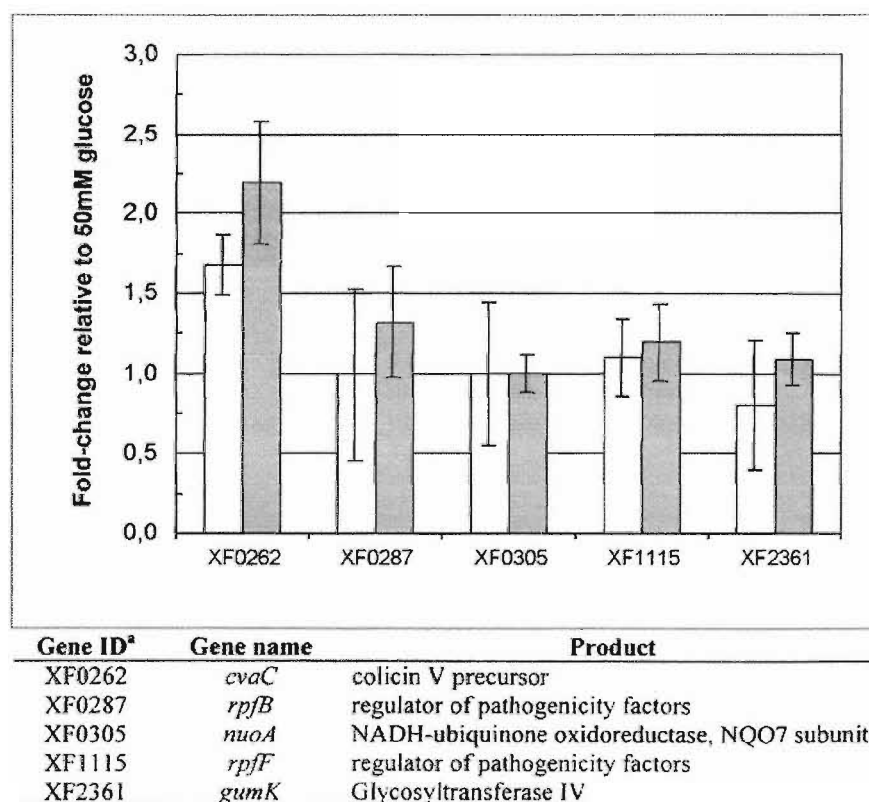
(Ma et al., 1999) and the Lon protease homologue of *Brucella abortus* is essential for survival in a variety of stresses (Robertson et al., 2000).

When cultivated at 250 mM glucose *X. fastidiosa* also up-regulates two CDS (XF0032 and XF1224) that encode PilY1, a transmembrane protein involved in export and correct assembly of the Type-IV pili (Alm et al., 1996). Type IV pili are multifunctional devices at the bacterial surface that can act as virulence factors because of pilus-based motility or formation of biofilms (Nudleman and Kaiser, 2004). Fimbriae- and pili-mediated attachment of *X. fastidiosa* to xylem or cibarium has been suggested as essential to successful colonization (Purcell and Hopkins, 1996; Simpson et al., 2000). Other virulence determinants induced on high glucose include colicin-V relates genes, which will be further discussed below.

Surprisingly, based on our microarray data, the *rpf* and *gum* genes were not induced by the glucose increment used in this study. This was further confirmed by real-time quantitative PCR performed with selected genes (Fig. 3). Our initial premise was that fastidian gum production would be increased as a function of glucose concentration, as observed for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Vojnov et al., 2001) and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (our unpublished results). These results are specially intriguing since RpfB and RpfF are 70% and 44% identical, respectively, between *X. fastidiosa* and *X. axonopodis* pv. *citri*. These genes are essential to the synthesis of a diffusible signal factor (DSF) (Barber et al., 1997) which in turn activates a transduction pathway that leads to transcriptional regulation of genes required for pathogenic traits, such as EPS and exoenzyme synthesis (Slater et al., 2000). The expression of *rpf* and *gum* genes in *X. fastidiosa* has been recently shown to be affected by cell density *in vitro*, being significantly induced at high density conditions (Scarpari et al., 2003). Taken together, these observations lead us to conclude that cell density but not nutrient availability triggers fastidian gum production.

X. fastidiosa expresses colicin-V-like toxins and putative anti-toxin

X. fastidiosa 9a5c genome encodes two colicin-like precursor proteins encoded by *cvaC* genes XF0262 and XF0263 (Simpson et al., 2000). Colicin-V is an antibacterial polypeptide toxin produced by *E. coli*,



^a according to Simpson *et al.*, 2000.

FIG. 3. Gene expression of selected CDS in response to glucose variations. Real-time quantitative polymerase chain reactions using templates derived from total RNA samples of *X. fastidiosa* cultures grown at 1 mM glucose (white bars) and 250 mM glucose (gray bars) compared to the standard growth condition (50 mM glucose). Standard error bars from three independent experiments are shown. XF0305 (NADH-ubiquinone oxidoreductase, NQO7 subunit) was used as the normalizer of total RNA input.

WHOLE-GENOME EXPRESSION PROFILING OF *XYLELLA FASTIDIOSA*

which acts against closely related sensitive bacteria (Havarstein et al., 1994). Its synthesis is regulated by CvpA and activation and secretion depend on two other proteins, CvaB and CvaA. The first is an ATP-dependent ABC transporter inserted in the inner membrane of the cell, which transports colicin from the cytosol to the periplasm after the cleavage of a signal peptide, and the second is a transport protein inserted in the outer membrane that transports colicin from the periplasm to the external medium, usually with assistance of TolC (Waters and Crosa, 1991; Skvirsky et al., 1995; Zhang et al., 1995). In *X. fastidiosa* 9a5c *cvaA* and *cvaB* are dispersed in the chromosome (Simpson et al., 2000), different from *E. coli*, where these genes are organized in operon present in plasmid pColV (Gilson et al., 1987). Processed colicin-V is lethal against bacteria that have a specific receptor (Cir) but do not express a protein (Civ) that confers immunity against it (Zhang et al., 1995).

Our microarray results indicated that *cvaC* XF0262 and the neighboring XF0264 are up-regulated in cells grown at 250 mM glucose (Table 3). Induction of XF0262 was also verified by real-time quantitative PCR (Fig. 3). XF0264 is currently annotated as hypothetical, despite its strong aminoacid similarity to the other two *cvaC* found in *X. fastidiosa* 9a5c genome (Fig. 4A). The tandem organization of the *cvaC* genes in this strain suggests a genomic expansion as this gene is found as single-copy in other strains of *X. fastidiosa* with genomes complete (*X. fastidiosa*-Temecula) or partially sequenced (*X. fastidiosa*-Ann1 and *X. fastidiosa*-Dixon) (Bhattacharyya et al., 2002; Van Sluys et al., 2003). *cvpA* (XF1948) was also up-regulated in this condition, while *cvaA*, *cvaB* and *tolC* were not.

A

```

XF0263 MRELTSIEMN NVSGGDLATR IEASIVFGVS AFFAGSIWGG TRGGDGGGIL GVGSIAGQVG
XF0264 MRELTSIEMN NVSGGDFATR LEASIVGGIA AFFAGSIWGG TRGGDGGGVL GIGSIGQGVG
XF0262 MRELTLEID NVSGADLGR LSAIVGGVA AFFAGSIWGG TRGGDGGGIL GVGSIAGQVG
      ***** *:: ***** *::: * :. *: * *:: ***** ***** * *::: * *::: *****

```

```

XF0263 MVYGGIVGGI GGLIAGFVLD KNVTYNYAVG FYNLFNGTFTK (283nt)
XF0264 MVYGGIAGAI GGAIGCFVLD KDVTYSYTTG FMNSLFSGNFAK (227nt)
XF0262 MVYGGIAGAI GGAIGFVLD KDVIYSYTNQ FMSSIFNGTFAK (205nt)
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

B

```

-----HHHHHHHHHH--HHHEHHHHHHH-H-----HHHHEHHHHHHHEEEEE-----
Q841V5 MDRKRTKLELLFAFIINATAIYIALAIYDCVFREKDFLSMHTFCFSALMSAICYFVGDNY
XF0261 MRSLFGQVFN TNPSDVNEDTVSASLAG-FWFKLSSRIERVLGSLGROFAGQGY
      -----E-----HHH-HHH.HHHHH--HHHHHHHHH-HHHH-----

-----
Q841V5 YSISDKIKRRSYENS DSK
XF0261 LWERTDSAQN FELN
      EEE-----

```

FIG. 4. (A) Comparison of *X. fastidiosa* 9a5c CvaC proteins. The deduced aminoacid sequences of XF0262, XF0263 and XF0264 were aligned using CLUSTALW. Identical and conserved aminoacids are denoted with (*) and (:), respectively. Sequences encoded by spotted amplicons are underlined. (B) Pairwise alignment of candidate *X. fastidiosa* Cvi with *E. coli* Cvi. The deduced amino acid sequences of XF0261 and *E. coli* *cvi* (UniProt accession number Q841V5) were aligned. Bold and underlined letters represent identical and conserved aminoacids, respectively. Secondary structures were predicted using NNPREPDICTION. H and E represent helices and β -strands, respectively.

Although the colicin-V secretory machinery is complete in *X. fastidiosa* 9a5c, paradoxically no gene encoding a putative immunity protein (*cvi*) was annotated based on Blast searches (Simpson et al., 2000). We then reasoned if a *cvi* analog could be among hypothetical CDS co-regulated with *cvaC*. Among these, the gene that fulfilled the requirements for a *X. fastidiosa* *cvi* was the hypothetical CDS XF0261, exactly upstream of the *cvaC* genes. XF0261 encodes a protein with similar size to *E. coli* *cvi* (66 and 74 aminoacids, respectively) and despite their low sequence similarity shown by pair-wise alignment, their predicted secondary structure turned out to be quite similar (Fig. 4B). Both are rich in helices in the central region and have a small fraction of β -sheets at the carboxi terminus. It has been proposed that the helix-rich structure allows *cvi* insertion in the inner membrane in *E. coli* (Waters and Crosa, 1991). Further experimentation to demonstrate the functionality of this putative *X. fastidiosa* Cvi is warranted. If indeed XF0261 is a *cvi* analog, we can postulate that *X. fastidiosa* is capable of synthesizing, secreting and defending itself against colicin-V. A model for this response is presented in Figure 5. Colicin secretion would allow efficient competition within the xylem and/or insect foregut. In fact, it has been demonstrated that *X. fastidiosa* lives in an endophytic environment in citrus plants (Araujo et al., 2001; Lacava et al., 2004).

X. axonopodis pv *citri*, a member of the same family as *X. fastidiosa*, also infects orange trees but seems incapable of producing colicin-V since *cvaA* and *cvaC* are absent. In *X. campestris* pv *campestris*, besides *cvaA* and *cvaC*, *cvaB* was not found (da Silva et al., 2002). A possible explanation for this is the different life style and habitat of *Xanthomonas*. By living in the mesophyl, an environment rich in nutrients and carbon sources, and by being able to intensively degrade plant tissues, they might not need to antagonize other bacteria in order to reduce local competition, differently from *Xylella*.

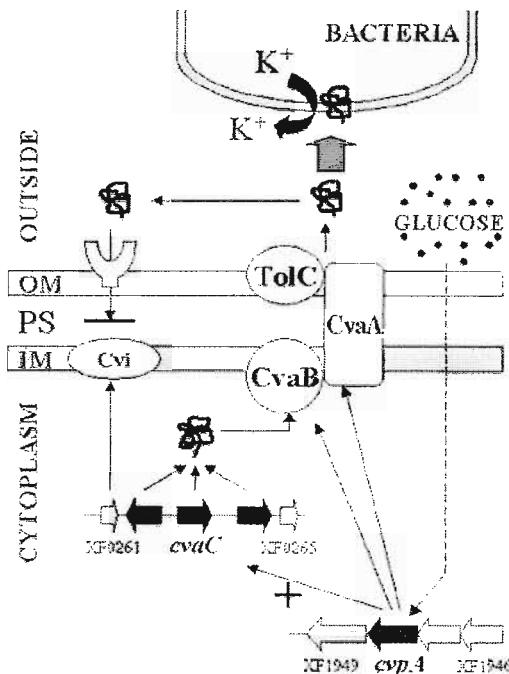


FIG. 5. Model of regulation, synthesis and immunity against colicin-V produced by *X. fastidiosa* 9a5c. Presence of the XF0261 protein inhibits colicin-V toxicity against *X. fastidiosa* 9a5c but allows K^+ efflux, cell membrane imbalance and death of susceptible bacteria. IM, PS, and OM indicate inner membrane, periplasm and outer membrane, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). We are greatly indebted to Dr Hugo A. Armelin for coordinating the Cooperation for Analysis of Gene Expression (CAGE) Project. A.M.D.S. and S.P. were partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, (CNPq). L.M.M., R.Z.N.V. and P.A.Z. are FAPESP doctoral fellows.

SUPPLEMENTAL METHODS

DNA microarray construction

According to Koide et al. (2004). See: <http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray/glucose>. PCR primers were designed to amplify unique internal fragments of 200-1000 bp of each predicted CDS described in the annotated genome sequence of *X. fastidiosa* strain 9a5c (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br/xf>). Primers (18–23mers) with equivalent predicted melting temperature were designed with the use of a perl program that ran PRIMER3 (www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) for the complete CDS list, automatically testing many parameter settings and also guaranteeing that primers hybridized only to a single genome location. Oligonucleotides were synthesized by MWG and Operon Technologies. Genomic or cosmid DNA, obtained in the *X. fastidiosa* genome sequencing project (Simpson et al., 2000), were used as template in the first round of PCR amplification, and 200-fold-diluted PCR products were used as templates for PCR reamplification to increase product concentration when necessary.

The reactions were done in 96-well plates. The mixture in each well contained 100 ng of DNA, 0.5 U of Biolase Taq polymerase (Bioline), 0.2 mM of each dNTP (Invitrogen), 1.5 mM MgCl₂ and the primers at 0.5 μ M, in a total volume of 100 μ L. A 5-min denaturing step at 95°C was applied, followed by 40 cycles of 95°C for 45 sec, 50°C for 30 sec, 72°C for 1 min and a final step at 72°C for 10 min. 4 μ L of each PCR reaction were checked for product size and concentration by electrophoresis in 1.2% agarose gels. The amplicons were then purified with 96-well MultiScreen purification plates (Millipore), and an equal volume of dimethyl sulfoxide was added to the purified products (~100 ng/ μ L final concentration). Generation III DNA spotter (Amersham Biosciences) was used to array the samples onto coated type-7 glass slides (Amersham Biosciences). This spotter arrays two technical replicas of each sample, one in each longitudinal half of the slides. Thus, a 6152-element array was printed, representing 2692 CDS spotted at least in duplicate. After deposition, the spotted DNA samples were crosslinked to the coated slides by applying 50 mJ of UV light and the slides were stored desiccated at ~10% relative humidity at room temperature until use.

Hybridization conditions

Labeled DNA or cDNA fragments from both strains were combined in the hybridization mixture containing 50% formamide and hybridization buffer (Amersham Biosciences) in a final volume of 54 μ L. The mixture was heated to 92°C for 2 min, cooled on ice, and applied to the microarray. A cover slip was used to spread the solution throughout the microarray and the slide was then placed in a 50-mL Falcon tube that was sealed and horizontally positioned for hybridization in a 42°C water bath for 16 h. After hybridization, slides were washed at 55°C for 10 min in 1 \times SSC buffer containing 0.2% SDS and twice for 10 min in 0.1 \times SSC buffer containing 0.2% SDS, followed by 1 min at room temperature in 0.1 \times SSC and a quick rinse in ddH₂O. After drying with N₂ in a clean room, the slides were ready for scanning.

Data acquisition and analysis

A Generation III DNA scanner (Amersham Biosciences) was used to acquire monochromatic images of 10 μ m/pixel from the microarray slides, corresponding to channels Cy3 (532-nm laser and PMT at 700 V) and Cy5 (633-nm laser and PMT at 750 V). Images were analyzed with ArrayVision 7.0 software (Imaging Research Inc.). The median-trimmed mean density (MTMdens) of signal intensity was the measure chosen for signal quantification. This measure removes pixels with signals below or above 4 MADs (median

of absolute deviation) of the mean signal intensity of all pixels within a spot, such as those representing dust particles. The median of the background intensity was calculated for a frame of $24,000 \mu\text{m}^2$ around each spot of $180 \mu\text{m}$ in diameter, and the value was subtracted from the spot's MTMdens value. This represents the raw data used in the normalization procedure.

Normalization procedure

Several imbalance errors affect the true ratio measure. We have assumed that all imbalance due to enzyme efficiency, wavelength detection, dye and brightness can be approximated by multiplicative factors that are contained into just one normalization constant that depends non-linearly on signal intensities. In order to normalize the Cy3 and Cy5 background-subtracted signal intensities (I_{Cy3} and I_{Cy5}), we have used the hypothesis that the great majority of genes are not differentially expressed and therefore the predominant ratio must be one. This is a reasonable hypothesis given that our microarray contains fragments of all CDS of the 9a5c strain genome. We have performed the LOWESS fitting on M vs S plot in order to obtain, locally and non-parametrically, the normalization constant and thus normalized ratios, following Yang et al. (2002). As defined in our work, $S = \log_2((I_{\text{Cy5}} + I_{\text{Cy3}})/2)$ and $M = \log_2(I_{\text{Cy5}}/I_{\text{Cy3}})$. Lowess normalization eliminated the dye bias of the ratios.

Intensity-dependent ratio cutoff level

We have performed homotypical (or self-self) hybridizations (9a5c strain independently grown in 50 mM of glucose labeled with either Cy3-dCTP or Cy5-dCTP and hybridized simultaneously to the same microarray) in order to derive intrinsic experimental variability of the 1:1 ratio (noise) and to set an upper and lower limit for this noise. With this approach, we have detected a clear dependence between ratio, estimated by M, and average foreground intensity of each CDS, estimated by S. Fold change of CDS with intensities above but close to background strongly varied inside $[0; \infty]$, or in logarithm scale, inside $[-(\cdot; \infty]$ when the expected result is ratio = 1 or $\log_2(\text{ratio}) = 0$. We used three independent experiments (three slides, six images, two biological replicas) as samplings from experimental error around 1:1 bi-dimensional probability density distribution. We conditioned this distribution in arbitrary S intervals to make it one-dimensional and estimated the density distribution using Kernel Density Estimators (Silverman, 1986). Finally, we integrated this density around mode peak until 0.995 probability was reached, to determine an intensity-dependent ratio cutoff level. These cutoffs levels were subsequently used in the analysis of replicas of hybridization experiments; spots outside these credibility intervals present strong evidence against 1:1 ratio. The method used is an improvement of the rationale introduced by Koide et al. (2004) and is available online at <http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/HTself>.

REFERENCES

- ALM. R.A., HALLINAN, J.P., WATSON, A.A. et al. (1996). Fimbrial biogenesis genes of *Pseudomonas aeruginosa*: pilW and pilX increase the similarity of type 4 fimbriae to the GSP protein-secretion systems and pilY1 encodes a gonococcal PilC homologue. *Mol Microbiol* **22**, 161–173.
- ALMEIDA, R.P., MANN, R., and PURCELL, A.H. (2004). *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. *Curr Microbiol* **48**, 368–372.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFER, A.A., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- ARAUJO, W.L., MACCHERONI, W., JR., AGUILAR-VILDOSO, C.I., et al. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can J Microbiol* **47**, 229–236.
- BARBER, C.E., TANG, J.L., FENG, J.X., et al. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* **24**, 555–566.
- BHATTACHARYYA, A., STILWAGEN, S., REZNIK, G., et al. (2002). Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Res* **12**, 1556–1563.
- BRAZMA, A., HINGAMP, P., QUACKENBUSH, J., et al. (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat Genet* **29**, 365–371.

WHOLE-GENOME EXPRESSION PROFILING OF *XYLELLA FASTIDIOSA*

- CAMPANHARO, J.C., LEMOS, M.V., and LEMOS, E.G. (2003). Growth optimization procedures for the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol* **46**, 99–102.
- CHANG, C.J., GARNIER, M., ZREIK, L., et al. (1993). Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Curr Microbiol* **27**, 137–142.
- CHURCHILL, G.A. (2002). Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet (Suppl)*: **32**, 490–495.
- DA SILVA, A.C., FERRO, J.A., REINACH, F.C., et al. (2002). Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**, 459–463.
- DA SILVA, F.R., VETTORE, A.L., KEMPER, E.L., et al. (2001). Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *Fems Microbiol Lett* **203**, 165–171.
- DE SOUZA, A.A., TAKITA, M.A., COLETTA-FILHO, H.D., et al. (2003). Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 867–875.
- DE SOUZA, A.A., TAKITA, M.A., COLETTA-FILHO, H.D., et al. (2004). Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett* **237**, 341–353.
- DOW, J.M., and DANIELS, M.J. (2000). *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* **17**, 263–271.
- FEIL, H., FEIL, W.S., DETTER, J.C., et al. (2003). Site-directed disruption of the *fimA* and *fimF* fimbrial genes of *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* **93**, 675–682.
- GILSON, L., MAHANTY, H.K., and KOLTER, R. (1987). Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J Bacteriol* **169**, 2466–2470.
- HARTREE, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* **48**, 422–427.
- HOPKINS, D.L., and PURCELL, A.H. (2002). *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *Plant Dis* **86**, 1056–1066.
- KESSEL, M., MAURIZI, M.R., KIM, B., et al. (1995). Homology in structural organization between *E. coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J Mol Biol* **250**, 587–594.
- KNELLER, D.G., COHEN, F.E., and LANGRIDGE, R. (1990). Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neural network. *J Mol Biol* **214**, 171–182.
- KOCK, H., GERTH, U., and HECKER, M. (2004). The ClpP peptidase is the major determinant of bulk protein turnover in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**, 5856–5864.
- KOIDE, T., ZAINI, P.A., MOREIRA, L.M., et al. (2004). DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J Bacteriol* **186**, 5442–5449.
- LACAVAL, P.T., ARAUJO, W.L., MARCON, J., et al. (2004). Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. *Lett Appl Microbiol* **39**, 55–59.
- LEITE, B., ANDERSEN, P.C., and ISHIDA, M.L. (2004). Colony aggregation and biofilm formation in xylem chemistry-based media for *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett* **230**, 283–290.
- LEMOS, E.G., ALVES, L.M., and CAMPANHARO, J.C. (2003). Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett* **219**, 39–45. [Erratum in *FEMS Microbiol Lett* (2004) **231**, 299.]
- LI, W.B., ZREIK, L., FERNANDES, N.G., et al. (1999). A triply cloned strain of *Xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. *Curr Microbiol* **39**, 106–108.
- LIVAK, K.J., and 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**, 402–408.
- MA, J.F., OCHSNER, U.A., KLOTZ, M.G., et al. (1999). Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 3730–3742.
- MACHADO, M.A., SOUZA, A.A., COLETTA-FILHO, H.D., et al. (2001). Genome and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*. *Mol. Biol. Today* **2**, 33–43.
- MCELDRONE, A.J., SHERALD, J.L., and FORSETH, I.N. (2001). Effects of water stress on symptomatology and growth of *Parthenocissus quinquefolia* infected by *Xylella fastidiosa*. *Plant Dis* **85**, 1160–1164.
- MOREIRA, L.M., DE SOUZA, R.F., ALMEIDA, N.F., JR., et al. (2004). Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 163–184.
- NEWMAN, K.L., ALMEIDA, R.P., PURCELL, A.H., et al. (2003) Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7319–7327.
- NEWMAN, K.L., ALMEIDA, R.P., PURCELL, A.H., et al. (2004). Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 1737–1742.

- NUDLEMAN, E., and KAISER, D. (2004). Pulling together with type IV pili. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**, 52–62.
- NUNES, L.R., ROSATO, Y.B., MUTO, N.H., et al. (2003). Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. *Genome Res* **13**, 570–578.
- OSIRO, D., COLNAGO, L.A., OTOBONI, A.M., et al. (2004). A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiol Lett* **236**, 313–318.
- PURCELL, A.H., and HOPKINS, D.L. (1996). Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 131–151.
- ROBERTO, S.R., COUTINHO, A., DE LIMA, J.E.O., et al. (1996). Transmissão de *Xylella fastidiosa* pelas cigarrinhas *Dilobopterus costalimai*, *Acrogonia terminalis* e *Oncometopia facialis* em citros. *Fitopatol. Bras.* **21**, 517–518.
- ROBERTSON, G.T., KOVACH, M.E., ALLEN, C.A., et al. (2000). The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Mol Microbiol* **35**, 577–588.
- SCARPARI, L.M., LAMBIAIS, M.R., SILVA, D.S., et al. (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.
- SILVERMAN, B.W. (1986). *Density Estimation* (Chapman and Hall, London).
- SIMPSON, A.J., REINACH, F.C., ARRUDA, P., et al. (2000). The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**, 151–157.
- SKVIRSKY, R.C., REGINALD, S., and SHEN, X. (1995). Topology analysis of the colicin V export protein CvaA in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **177**, 6153–6159.
- SLATER, H., ALVAREZ-MORALES, A., BARBER, C.E., et al. (2000). A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **38**, 986–1003.
- SMOLKA, M.B., MARTINS, D., WINCK, F.V., et al. (2003). Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics* **3**, 224–237.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., and GIBSON, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- TYSON, G.E., STOJANOVIC, B.J., KUKLINSKI, R.F., et al. (1985). Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. *Phytopathology* **75**, 264–269.
- VAN SLUYS, M.A., DE OLIVEIRA, M.C., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., et al. (2003). Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol* **185**, 1018–1026.
- VAN SLUYS, M.A., MONTEIRO-VITORELLO, C.B., CAMARGO, L.E., et al. (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 169–189.
- VOJNOV, A.A., SLATER, H., DANIELS, M.J., et al. (2001). Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 768–774.
- WATERS, V.L., and CROSA, J.H. (1991). Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* **55**, 437–450.
- YANG, Y.H., DUDOIT, S., LUU, P., et al. (2002). Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**, e15.
- ZHANG, L.H., FATH, M.J., MAHANTY, H.K., (1995). Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics* **141**, 25–32.

Address reprint requests to:
 Dr. Ana C.R. da Silva
 Alellyx Applied Genomics
 Rua James C. Maxwell 320
 Techno Park, 13067-850
 Campinas, SP, Brasil

E-mail: ana.rasera@alellyx.com.br

4 – Discussão

4.1 - Análise geral do transcriptoma de *Xf* em resposta ao nível de glicose do meio

O cultivo de *Xf* nas condições extremas (1 mM e 250 mM) em relação à quantidade de glicose que chamamos padrão (50 mM) em meio XDM₂ (Lemos et al 2003) nos mostrou que *Xf* sofre um grande “desligamento” da expressão gênica, da mesma forma que observada em outros organismos sob outras condições estressantes (Kanesaki et al 2002; Pysz et al 2004). Na condição de 1 mM de glicose, foram detectados (expressos) apenas 19,5% das 2848 CDS anotadas de *Xf* (Koide et al 2004; Simpson et al 2000) enquanto na condição de 250mM, foram detectados 60,1% e na condição padrão 75,2% dos genes mostraram-se expressos. Estas porcentagens de expressão de CDS nos pareceram muito condizentes quando comparada com a curva de crescimento mostrada pela figura 1 do artigo anexado e com dados previamente descritos de transcriptoma de outros organismos em diferentes condições fisiológicas testadas (Gao et al 2004; Han et al 2004). Partindo do princípio que todas as extrações de RNA foram feitas no 6º dia de cultivo de *Xf*, uma breve análise das curvas nos mostra claramente que faz sentido o desligamento da expressão gênica nas condições extremas testadas. Interessante observar que em 1 mM ocorreu uma porcentagem maior de genes não expressos (80%), do que em 250 mM (40%). Tal fato, embora pareça contrapor-se à quantidade de proteína obtidos no 6º dia, se justifica ao olhar a tendência das curvas. Percebe-se que na condição 250 mM, *Xf* mostra-se em uma curva ascendente de crescimento, enquanto em 1 mM a curva já dá sinais de que o ambiente se tornou muito pobre para sua sobrevivência entrando em declínio. Embora a concentração de 1 mM tenha sido a condição de crescimento que induziu uma menor expressão gênica em *Xf*, ao mesmo tempo foi a condição fisiológica testada que, incluindo as concentrações do projeto piloto (onde foram testadas concentrações de glicose de 10 mM e 25 mM, que não geraram resultados expressivos no microarranjo de DNA), foi a que mais mimetizou as concentrações de glicose no xilema da planta (Redak et al 2004), apesar que no caso do xilema existem outras fontes de carbono como por exemplo ácidos orgânicos. Mas de qualquer forma isto nos permite correlacionar o nível de expressão com a taxa de crescimento de *Xf in vivo*. Relatos mostram que *Xf* leva em torno de 7 a 10 anos para provocar a morte do vegetal (fundecitrus website) e este elevado tempo pode ser em virtude da baixa atividade celular decorrente da carência de açúcar no meio. Não coincidentemente, vale ressaltar que são as vias de metabolismo energético que fornecem subsídios metabólicos para uma bactéria entrar em divisão celular, e

que a maior fonte de metabolismo energético em microrganismos geralmente são os açúcares (Schulze & Lipe 1964).

Em de *Xf*, para agravar ainda mais a situação, a ausência de uma completa maquinaria de degradação de parede celular ou mesmo de pectina, associada com a escassez de mecanismos de captura de açúcares, com destaque especial para o incompleto sistema de captação de fructose (PTS-Fru) e dos genes *kdg* (ceto deoxiglucanato, captação de açúcares) (Moreira et al 2004), e de vias importantes como a gliconeogênese estar incompleta e a B-oxidação ausente parecem corroborar com a “fastidiosidade” deste organismo (Simpson et al 2000). Isso faz da via glicolítica e das vias de transaminação as prováveis vias energéticas responsáveis por suprir a necessidade metabólica de *Xf* (Lemos et al 2003).

Durante o período de testes para a escolha das concentrações de glicose a serem usadas para este trabalho, várias concentrações de glicose foram testadas, dentre elas 10 mM, 25 mM e 75 mM, mas estas não nos trouxe uma significativa alteração de expressão gênica em termos de microarranjo de DNA. Em virtude disto, passamos a usar concentrações mais extremas para que nos possibilitasse visualizar tais diferenças. Dentro deste contexto, consideramos que a fase ideal para extração de RNA seria no mesmo momento da condição padrão (6º dia) pensando em manter todos os outros parâmetros controlados, embora as curvas de crescimento nos mostre que nas outras duas condições (1 mM e 250 mM) *Xf* não esteja em fase log e as culturas possuem densidade celular diferentes. Referente a isso, podemos dizer que não houve um ponto de intersecção entre as três curvas na fase log, o que tornaria a extração de RNA viável em um mesmo estágio, assumindo que também estivessem em uma densidade celular ideal para a obtenção de uma considerável soma de RNA. A condição padrão entrou em fase logarítmica rapidamente, igualmente observado na condição 1 mM, ao passo que na condição 250 mM a fase logarítmica aparece apenas após o 8º dia. Este detalhe não foi detectado em tempo hábil para que se pudessem realizar os testes de microarranjos de DNA da forma que seria ideal, ou seja, com a densidade celular em fase log nas 3 condições do dia de extração.

Um resultado importante e inesperado descrito neste trabalho se refere a genes deletados por análise comparativa com outro genoma de *Xylella fastidiosa*, mas que pelos microarranjos de DNA se mostraram serem funcionais. Van Sluys e colaboradores (2003), na tentativa de comparar as informações geradas a partir do seqüenciamento completo do

genoma de *Xf* Temecula, não confirmaram 511 CDS das 2848 previamente determinadas por Simpson (2000) em *Xf* 9a5c. Esta ausência de confirmação teve apenas caráter comparativo e não alterou o banco de dados de *Xf* 9a5c. Como a montagem das lâminas de *Xf* antecedeu a publicação de Van Sluys (2003), a nossa lâmina contém todas estas CDS que estes autores não levaram em consideração. O fato é que das 511 CDS não confirmadas por Van Sluys no genoma de 9a5c, 211 deram sinal de expressão podendo, portanto, serem consideradas genes ativos e que devem apresentar uma função celular. Ampliando nossas análises, comparamos a seqüência destas 211 CDS de 9a5c contra o genoma de *Xf* Temecula. Para nossa surpresa, 187 CDS destas 211 apresentam seqüências homólogas no genoma de *Xf* Temecula. Desta forma, nós podemos inferir que a técnica de microarranjos de DNA também pode servir como uma ferramenta de anotação e/ou validação de anotação de genomas.

4.2 - Regulação e síntese de goma e de fatores de virulência mediados por genes *rpf*

Nossos resultados com os microarranjos de DNA mostraram que não houve variação na expressão dos genes *rpf*. Uma possível justificativa é que, os genes *rpfF* e *rpfB* de *Xf*, ao contrário de *Xcc* no qual se encontram em *tandem*, estão separados por 780kpb, como mostrado na figura A. A regulação de *rpfF* e *rpfC* em *Xcc* é dada por dois promotores independentes, e o promotor de *rpfB* pode atuar promovendo também a transcrição de *rpfF*, embora este também tenha seu promotor específico (Tang et al 1991). A independência de promotores em *Xf* pode dificultar a síntese de DSF, ao passo que em *Xcc* a sua síntese aparenta ser regulada por um promotor comum a ambos os genes. Esta expressão de DSF potencialmente dificultada acarretaria uma diminuição na expressão dos genes de goma, correlacionado com *rpf*, e conseqüentemente uma redução na patogenicidade de *Xf* quando comparada com *Xcc*. Dados em *Xcc* (Katzen et al 1998; Vojnov et al 2001) já mostraram que a diminuição na produção de goma diminui a patogenicidade do organismos.

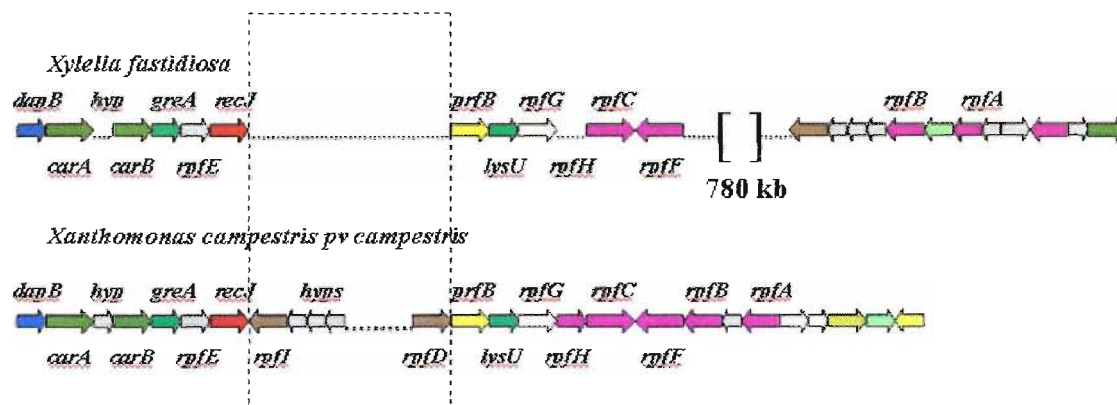


Figura A: Comparação da organização gênica dos genes *rpf* em *Xf* e *Xcc*. Figura original gentilmente cedida por Leandro Marcio Moreira.

Embora todos os genes relacionados com a síntese de goma sejam expressos, segundo os critérios relatados no artigo em anexo, observou-se que estas expressões não foram diferenciais nas condições testadas. Estes resultados foram então validados e certificados por qRT-PCR usando como referencial oligonucleotídeos específicos para o gene *gumK* (ver figura 3 do artigo anexado).

A partir destes resultados, mostramos que o controle de expressão dos genes de goma nas variações de glicose que propusemos não provocou alterações nos níveis transcricionais, mostrando que o controle de expressão de goma em *Xf* não se adapta ao modelo proposto por Vojnov (2001), onde uma maior concentração de açúcar no meio regula positivamente a expressão dos genes de goma em *Xcc*. No entanto, uma vez que os genes foram detectados como expressos em todas as condições, sugerimos que esta regulação seja feita de outro modo, ainda desconhecido. Os qRT-PCR dos genes *rpf*, que também não mostraram alteração no nível de expressão em todas as condições testadas, corroboram para a afirmação de que os níveis extremos de glicose não interferem regulando a produção de DSF (ver figura 3 do artigo). Todos estes dados são interessantes uma vez que *Xf* vive em um ambiente onde a concentração de açúcar é pelo menos 10x mais baixa que a concentração mínima que nós impusemos neste trabalho (Redak et al 2004), e a concentração de açúcar como reguladora destes genes não foi evidenciada, ainda que o biofilme, no qual a goma tem participação na formação é considerado como um dos fatores que contribuem para a patogenicidade de *Xf* (da Silva et al 2001; de Souza et al 2004; Dow & Daniels 2000). Um esquema mostrando o funcionamento destes genes pode ser visto na figura B.

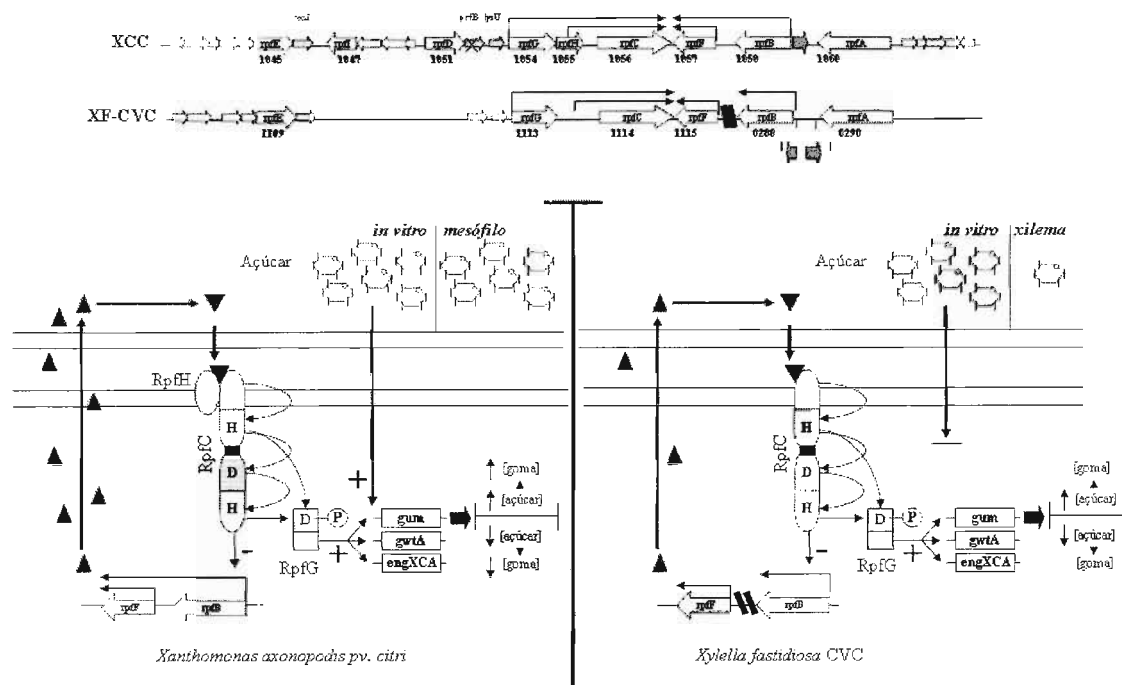


Figura B: Disposição dos produtos gênicos dos *rpf* e suas respectivas regulações em *Xcc* e *Xf*. O produto de *rpfC* é uma proteína que permeia a membrana interna e que possui dois domínios, um receptor e um regulador. O domínio sensor é capaz de receber sinais do meio externo, provocando a sua autofosforilação. Estes sinais podem ter participação de DSF. *rpfH* é uma proteína acessória que pode ajudar na ligação do estímulo ao *rpfC*. A autofosforilação de *rpfC* inicia uma cascata até a fosforilação de *rpfG*, que fosforilado regula positivamente induzindo a expressão de genes relacionado a fatores de virulência, incluindo endoglucanases e genes de goma. *rpfC* quando autofosforilado também regula negativamente a expressão de *rpfF* e *rpfB* (Slater et al 2000). Ao analisar *Xf*, comparando-a com *Xcc*, o aumento da concentração de açúcar no meio não alterou significativamente a expressão dos genes de goma e dos genes *rpf*, que regulam a patogenicidade, como ocorreu em *Xcc* e pode ser observado na figura.

4.3 - Colicinas

Xf possui três genes responsáveis pela codificação do polipeptídeo *cvaC* (colicina), localizados no genoma nas posições XF0262, XF0263 e XF0264 cujas seqüências são capazes de codificar proteínas de 102 aminoácidos ainda na presença do peptídeo sinal, este

que se assemelha em 9 dos 15 resíduos encontrados na colicina V de *E.coli* (ver figura 4 do artigo).

Nos nossos testes com os microarranjos de DNA, a concentração de glicose de 250 mM fez com que os níveis de transcrição dos genes *cvaC* aumentassem duas vezes em relação a quantidade produzida pela condição padrão. Dado isto, realizamos experimentos de qRT-PCR de *cvaC* para que confirmássemos tal resultado (ver figura 3 do artigo). Em nossos resultados com os microarranjos de DNA também encontramos o gene *cvpA* mais expresso em 250 mM, sendo que seu produto gênico é uma proteína reguladora positiva dos genes *cvaC*, o que corrobora para a afirmação de que os genes que codificam para colicina V realmente estão sendo mais expressos nesta condição. Ao olharmos com atenção a região gênica onde está localizado *cvaC*, notamos um pequeno gene hipotético em *tandem* com os precursores de Colicina V que também apareceu como diferencialmente expresso em 250 mM glicose. Este gene hipotético (XF0261) posicionado a montante dos genes *cvaC*, quando analisado mais a fundo por similaridade de seqüências via *Blast*, apresentou certa homologia com o gene *cvi* de *E.coli*. Embora a similaridade de seqüências seja baixa quando comparada com outras proteínas do sistema de produção e transporte de Colicina V, as estruturas secundárias de ambos os genes (XF0261 e *cvi*) mostraram altos e conservados teores de alfa-hélices, necessárias para sua inserção na membrana. Baseado nestes dados sugerimos que XF0261 codifica para uma proteína análoga a proteína *cvi* de *E. coli*, fato que nos faz sentido uma vez que *Xf* estaria exportando sua própria toxina e, portanto, precisaria proteger-se. Adicionalmente, seria natural entender as pequenas diferenças estruturais entre as colicinas e proteínas de autoimunização produzidas por *Xf* e *E. coli*, uma vez que o intuito de ação por parte do agressor é justamente antagonizar com outras bactérias, e se imunização e colicinas produzidas fossem iguais entre diferentes bactérias não haveria tal antagonismo, impossibilitando, talvez, a sobrevivência do organismo naquele ambiente por aumento na competição por alimento e espaço. Um mecanismo que sugerimos foi feito à partir de Zhang (1995), que pode ser visto na figura 5 do artigo anexado.

O fato de *Xf* em meio com 250 mM glicose ter aumentado a expressão dos genes de colicina parece relacionar a concentração alta de glicose como causadora de algum tipo de choque osmótico na bactéria, que então percebe-se obrigada a defender-se produzindo toxinas para o meio, afim de antagonizar com outras possíveis bactérias. Acreditamos que a concentração de 50 mM não causou tal choque porque, embora tenha 500x mais açúcar que

dentro do xilema, estas bactérias já vinham sendo cultivadas em tal concentração. Conforme mostrou de Souza (2005), *Xf* após algumas passagens em mesmo meio perde a capacidade de expressar colicina V. Corroborando para tal fato o argumento de que em 1 mM a colicina também mostrou-se mais expressa que em 50 mM, embora em menor quantidade quando comparada com 250 mM (vide figura 5 do artigo). É interessante observar que a alta expressão de colicina nestes casos aparenta ser uma resposta à mudança da quantidade de açúcar no ambiente, usando como defesa a produção desta toxina até uma adaptação ao novo *habitat*. O fato de o gene *cvaC* estar mais expresso em 250 mM em relação à 1 mM acreditamos que seja devido ao fato de a condição 250 mM estar mais favorável ao crescimento celular no dia da extração de RNA total quando comparado a condição com 1 mM, onde a quantidade de glicose aparenta estar se esgotando.

A expressão de colicina em *Xf* apresentou como um importante aliado para promover a subsistência de *Xf* em mudanças de habitat ou de condições do mesmo, provocando antagonismo com outros organismos como uma ação preventiva de defesa a este novo ambiente no qual ela procurará sobreviver.

5 – Conclusão

As concentrações de glicose utilizadas neste trabalho mostraram grandes diferenças de expressão gênica, sendo que em 1 mM glicose houve apenas a expressão de 19,5%, em 250 mM glicose, 60,1% dos genes apareceram como expressos, enquanto na condição que chamamos de padrão, 50 mM, 75,2% dos genes mostraram-se ativos.

Quando comparadas tais condições com as representações de genes diferencialmente expressos, a condição 1 mM, no geral apresentou 14 CDS que só foram expressas nesta condição. Entre estas 14 destacamos duas: XF1067, que codifica para uma proteína transportadora de açúcar quando associada a ATP; e XF1187, uma subunidade proteolítica da protease Clp (ATP dependente), que está relacionada com a degradação de proteínas durante mudanças de estágios de crescimento em *Bacillus subtilis*.

A comparação dos genes diferencialmente expressos em 250 mM glicose (em relação ao padrão) gerou 39 CDS mais expressas (usando todos os dados, inclusive os que foram expressos exclusivamente em 250 mM glicose), sendo 26 CDS conservadas hipotéticas ou hipotéticas. Entre as CDS mais expressão merecem destaques os genes relacionados a colicinas que estariam relacionados a adaptação da bactéria ao ambiente mais rico em nutrientes e possivelmente mais propício a presença de outros microorganismos.

Interessantemente os genes relacionados a produção de goma não apresentaram um padrão de expressão aumentado com o aumento da concentração de açúcar como ocorre com outra bactéria relacionada com *Xf*, *Xcc*

A geração dos dados dos microarranjos de DNA e seus genes diferencialmente expressos também abrem muitas possibilidades que, embora obtidos os dados, não pudemos desenvolver um trabalho com mesmo afinco do que estes previamente relatados neste trabalho.

6 - Referências Bibliográficas

- Alfano JR, Collmer A. 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 42:385-414
- Almeida RP, Mann R, Purcell AH. 2004. *Xylella fastidiosa* cultivation on a minimal solid defined medium. *Curr Microbiol* 48:368-72
- Banks D, Albibi R, Chen J, Lamikanra O, Jarret RL, Smith BJ. 1999. Specific detection of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains. *Curr Microbiol* 39:85-8
- Bextine B, Tuan SJ, Shaikh H, Blua M, Miller TA. 2004. Evaluation of methods for extracting *Xylella fastidiosa* DNA from the glassy-winged sharpshooter. *J Econ Entomol* 97:757-63
- 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 USA* 99:12403-8
- Bhattacharyya A, Stilwagen S, Reznik G, Feil H, Feil WS, et al. 2002b. Draft sequencing and comparative genomics of *Xylella fastidiosa* strains reveal novel biological insights. *Genome Res* 12:1556-63
- Coletta-Filho HD, Takita MA, de Souza AA, Aguilar-Vildoso CI, Machado MA. 2001. Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* by a variable number of tandem repeat analysis. *Appl Environ Microbiol* 67:4091-5
- Crossman L, Dow JM. 2004. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. *Microbes Infect* 6:623-9
- da Silva FR, Vettore AL, Kemper EL, Leite A, Arruda P. 2001. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. *FEMS Microbiol Lett* 203:165-71
- de Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Caldana C, Goldman GH, et al. 2003. Analysis of gene expression in two growth states of *Xylella fastidiosa* and its relationship with pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 16:867-75
- de Souza AA, Takita MA, Coletta-Filho HD, Caldana C, Yanai GM, et al. 2004. Gene expression profile of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* during biofilm formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett* 237:341-53
- Dow JM, Daniels MJ. 2000. *Xylella* genomics and bacterial pathogenicity to plants. *Yeast* 17:263-71
- Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* 21:10-4
- Fath MJ, Mahanty HK, Kolter R. 1989. Characterization of a *purF* operon mutation which affects colicin V production. *J Bacteriol* 171:3158-61
- Fundecitrus website - www.fundecitrus.com.br
- Fu JF, Tseng YH. 1990. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Appl Environ Microbiol* 56:919-23
- Fukushima H. 1999. [Forensic DNA analysis--past and future]. *Nippon Hoigaku Zasshi* 53:276-84
- Gao H, Wang Y, Liu X, Yan T, Wu L, et al. 2004. Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Shewanella oneidensis*. *J Bacteriol* 186:7796-803
- Han Y, Zhou D, Pang X, Song Y, Zhang L, et al. 2004. Microarray analysis of temperature-induced transcriptome of *Yersinia pestis*. *Microbiol Immunol* 48:791-805
- Havarstein LS, Holo H, Nes IF. 1994. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Microbiology* 140 (Pt 9):2383-9

- Hendson M, Purcell AH, Chen D, Smart C, Guilhabert M, Kirkpatrick B. 2001. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. *Appl Environ Microbiol* 67:895-903
- Holt JG. 1994. *Xylella*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ed. JG Holt, pp. 100-15. London: Wilians and Wilkins
- Jansson PE, Kenne L, Lindberg B. 1975. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydr Res* 45:275-82
- Kanesaki Y, Suzuki I, Allakhverdiev SI, Mikami K, Murata N. 2002. Salt stress and hyperosmotic stress regulate the expression of different sets of genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem Biophys Res Commun* 290:339-48
- Katzen F, Ferreira DU, Oddo CG, Ielmini MV, Becker A, et al. 1998. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. *J Bacteriol* 180:1607-17
- Kennedy JFB, I.J. 1984. Production, Properties and applications of xanthan. . In *Progress in industrial microbiology*, ed. ME Bushell, pp. 319-71. Amsterdam: Elsevier/North Holland Publishing Corporation
- Koide T, Zaini PA, Moreira LM, Vencio RZ, Matsukuma AY, et al. 2004. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J Bacteriol* 186:5442-9
- Lemos EG, Alves LM, Campanharo JC. 2003. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiol Lett* 219:39-45
- Li WB, Zreik L, Fernandes NG, Miranda VS, Teixeira DC, et al. 1999. A triply cloned strain of *xylella fastidiosa* multiplies and induces symptoms of citrus variegated chlorosis in sweet orange. *Curr Microbiol* 39:106-8
- McElrone AJ, Seraldi JL, Forseth IN. 2003. Interactive effects of water stress and xylem-limited bacterial infection on the water relations of a host vine. *J Exp Bot* 54:419-30
- Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55:165-99
- Moreira LM, de Souza RF, Almeida NF, Jr., Setubal JC, Oliveira JC, et al. 2004. Comparative genomics analyses of citrus-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol* 42:163-84
- Moreira LM, De Souza RF, Digiampietri LA, Da Silva AC, Setubal JC. 2005. Comparative analyses of *xanthomonas* and *xylella* complete genomes. *Omic* 9:43-76
- Newman KL, Almeida RP, Purcell AH, Lindow SE. 2003. Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. *Appl Environ Microbiol* 69:7319-27
- Newman KL, Almeida RP, Purcell AH, Lindow SE. 2004. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1737-42
- Nunes LR, Rosato YB, Muto NH, Yanai GM, da Silva VS, et al. 2003. Microarray analyses of *Xylella fastidiosa* provide evidence of coordinated transcription control of laterally transferred elements. *Genome Res* 13:570-8
- O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30:295-304
- Osiro D, Colnago LA, Otoboni AM, Lemos EG, de Souza AA, et al. 2004. A kinetic model for *Xylella fastidiosa* adhesion, biofilm formation, and virulence. *FEMS Microbiol Lett* 236:313-8
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, et al. 1999. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23:41-6
- Pugsley AP. 1984. The ins and outs of colicins. Part I: Production, and translocation across membranes. *Microbiol Sci* 1:168-75

- Purcell AH, Hopkins DL. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 34:131-51
- Pysz MA, Connors SB, Montero CI, Shockley KR, Johnson MR, et al. 2004. Transcriptional analysis of biofilm formation processes in the anaerobic, hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Appl Environ Microbiol* 70:6098-112
- Redak RA, Purcell AH, Lopes JR, Blua MJ, Mizell RF, 3rd, Andersen PC. 2004. The biology of xylem fluid-feeding insect vectors of *Xylella fastidiosa* and their relation to disease epidemiology. *Annu Rev Entomol* 49:243-70
- Sandford PA, and J. Baird. 1983. Industrial utilization of polysaccharides. In *The polysaccharides*, ed. Aspinnall, pp. 411-90. New York: Academic Press, Inc.
- Schaad NW, Postnikova E, Lacy G, Fatmi M, Chang CJ. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. [correction] *fastidiosa* [correction] subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Syst Appl Microbiol* 27:290-300
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-70
- Schulze KL, Lipe RS. 1964. Relationship between Substrate Concentration, Growth Rate, and Respiration Rate of *Escherichia Coli* in Continuous Culture. *Arch Mikrobiol* 48:1-20
- Shalon D, Smith SJ, Brown PO. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6:639-45
- Sherlock G. 2000. Analysis of large-scale gene expression data. *Curr Opin Immunol* 12:201-5
- Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, Abreu FA, Acencio M, et al. 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. The *Xylella fastidiosa* Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* 406:151-7
- Slater H, Alvarez-Morales A, Barber CE, Daniels MJ, Dow JM. 2000. A two-component system involving an HD-GYP domain protein links cell-cell signalling to pathogenicity gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 38:986-1003
- Smolka MB, Martins D, Winck FV, Santoro CE, Castellari RR, et al. 2003. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics* 3:224-37
- Tang JL, Liu YN, Barber CE, Dow JM, Wootton JC, Daniels MJ. 1991. Genetic and molecular analysis of a cluster of *rpf* genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharide in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Mol Gen Genet* 226:409-17
- Tu IP, Schaner M, Diehn M, Sikic BI, Brown PO, et al. 2004. A method for detecting and correcting feature misidentification on expression microarrays. *BMC Genomics* 5:64
- Van Sluys MA, de Oliveira MC, Monteiro-Vitorello CB, Miyaki CY, Furlan LR, et al. 2003. Comparative analyses of the complete genome sequences of Pierce's disease and citrus variegated chlorosis strains of *Xylella fastidiosa*. *J Bacteriol* 185:1018-26
- Vojnov AA, Slater H, Daniels MJ, Dow JM. 2001. Expression of the gum operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 14:768-74
- Wells JM RB, Thompson JM, Lowe SK. 1981. Etiology of phony peach and plum leaf scald diseases. . In *Phytopathology*, pp. 1156-61.
- Wood DW, Setubal JC, Nester EW. 2004. Genome sequence analysis of prokaryotic plant pathogens. In *Plant microbiology*, ed. MaH Gillings, A., pp. 223-41: BIOS Scientific Publishers (Oxford, UK) in cooperation with Marcel Dekker

- Yue H, Eastman PS, Wang BB, Minor J, Doctolero MH, et al. 2001. An evaluation of the performance of cDNA microarrays for detecting changes in global mRNA expression. *Nucleic Acids Res* 29:E41-1
- Zhang LH, Fath MJ, Mahanty HK, Tai PC, Kolter R. 1995. Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics* 141:25-32